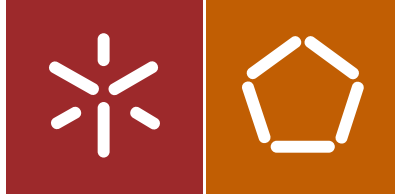


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Bianca Castanheira Caratão

Desenvolvimento e fabrico de estruturas para
aplicações biomédicas por electrospinning



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Bianca Castanheira Caratão

Desenvolvimento e fabrico de estruturas para
aplicações biomédicas por electrospinning

Dissertação de Mestrado
Ciclo de Estudos Integrados Conducentes ao
Grau de Mestre em Engenharia de Materiais

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professora Doutora Sandra Maria Fernandes Carvalho
Dr. Jorge Neiva Coutinho Marshall Corker

DECLARAÇÃO

Nome: Bianca Castanheira Caratão

Endereço eletrónico: bianca.caratao@gmail.com

Telefone: 258332021/ 917450933

Número do Bilhete de Identidade: 13945001

Título dissertação: Desenvolvimento e fabrico de estruturas para aplicações biomédicas por *electrospinning*

Orientadores: Professora Doutora Sandra Maria Fernandes Carvalho

Dr. Jorge Neiva Coutinho Marshall Corker

Ano de conclusão: 2014

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia de Materiais

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte desta dissertação.

Universidade do Minho, / /

Assinatura:

*Aos meus pais por todo o apoio
durante esta etapa da minha vida!*

*“Há sonhos que devem ser ressonhados
e projetos que não podem ser esquecidos...”*

Hilda Hilst

Agradecimentos

Esta dissertação não seria possível de realizar sem a contributo de um grupo de pessoas extraordinárias, as quais eu pretendo revelar os meus sinceros agradecimentos por toda a ajuda prestada.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Sandra Carvalho por ter confiado na minha capacidade desde o início desta dissertação. Agradeço também pela sua constante palavra de amizade e apoio fornecida, como também por toda a disponibilidade e incentivo para a realização deste trabalho. A partilha dos seus conhecimentos científicos, do seu espírito crítico e dos conselhos cedidos foram uma mais-valia e um estímulo para a minha aprendizagem. Gostaria também de agradecer o facto de tornar este trabalho mais enriquecedor tanto profissional como pessoal, devido à oportunidade oferecida para a sua realização no Instituto Pedro Nunes (IPN), em Coimbra. Foi sem dúvida uma honra trabalhar com a Professora durante estes dois anos.

Quero também agradecer ao meu coorientador Dr. Jorge Corker, pelo conhecimento científico fornecido, pelas ideias criativas partilhadas e pela colaboração na realização deste trabalho. Agradeço ao Professor Doutor Albano Cavaleiro, Doutor João Paulo Dias e Dr. Jorge Corker a possibilidade da realização da presente dissertação e por todos os meios colocados à disposição nas instalações do Instituto Pedro Nunes em Coimbra.

À Mariana Gonçalves do IPN, pelo inestimável apoio, orientação e permanente disponibilidade durante toda a realização desta dissertação. A competência científica transmitida associada à sua incansável prestabilidade permitiram alcançar a resposta para muitos problemas que em muito contribuíram para a execução desta dissertação. Agradeço igualmente pela disponibilidade demonstrada por todas as análises de SEM realizadas durante esta dissertação, assim como por toda a paciência durante esta etapa. Não foi só uma orientadora como uma amiga.

Ao Carlos Patacas um muito obrigada pela encomenda de todos os materiais utilizados nesta dissertação e por todo o tempo disponibilizado para me ouvir nos meus momentos mais desesperantes enquanto esperava pelas encomendas. Agradeço também por todo o apoio e conselhos transmitidos durante a realização desta dissertação.

À Cecília Lavrador pelo seu contributo nas viagens de casa até ao IPN e vice-versa, assim como todo o apoio durante a minha integração em Coimbra. À Vanessa Neto por toda a demonstração de amizade e por todas as conversas de apoio no laboratório. Ao Sérgio Lourenço e à Ivânia Marques, agradeço todas as palavras de amizade e as energias positivas transmitidas. Ao António Fonseca agradeço o auxílio prestado nas análises de SEM, quando o equipamento não cooperava. A todos as pessoas pertencentes ao laboratório de ensaios e desgaste de materiais, um muito obrigada por todo o apoio e amizade transmitido.

Ao Engenheiro Maurício Malheiro pela paciência para a explicação de algumas técnicas e por toda a disponibilidade e auxílio fornecida para a realização destes ensaios.

À Cristiana Alves por me ter ouvido sempre mesmo nos momentos mais difíceis, pelos conselhos cedidos e por todo o apoio fornecido durante a realização desta dissertação. As suas palavras de amizade e de tranquilidade ajudaram em muito na execução desta dissertação. Ao Edgar Carneiro e à Mariana Marques agradeço por todo o auxílio, atenção e disponibilidade para me ouvirem durante toda esta etapa.

A todos os meus colegas de curso, obrigada por estarem presentes durante toda a vida académica. Demonstraram não ser só colegas mas amigos que estiveram do meu lado durante esta fase, pela amizade, força e apoio em momentos críticos.

Às minhas colegas de casa, em especial à minha irmã Cátia Caratão, um muito obrigada pela forma que me acolheram e integraram em Coimbra. Agradeço também toda a demonstração de carinho, amizade, apoio e afeto transmitido durante esta etapa.

Ao Pedro Pereira, meu namorado, dirijo um agradecimento especial, pelo inestimável apoio, carinho e palavras diárias de ternura que ajudaram na total superação dos obstáculos ao longo desta caminhada de cinco anos. A sua transmissão de segurança e conforto foram sem dúvida um estímulo para continuar, mesmo nas fases mais difíceis. Um muito obrigada aos meus amigos pela amizade e entusiasmo sempre presente. E por último, aos meus pais e irmã, dirijo um especial agradecimento por sempre acreditarem em mim. E principalmente pelo apoio incondicional, incentivo e carinho diário demonstrado durante este percurso de cinco anos. Obrigada por me permitirem que chegasse até onde cheguei hoje.

Resumo

Os enxertos ósseos, tanto aloenxertos como xenoenxertos ou até substitutos artificiais, são atualmente as soluções cirúrgicas realizadas em ossos lesionados. No entanto, a estas cirurgias estão associadas limitações biológicas, destacando-se a transmissão de doenças e o número escasso de doadores. Sabendo *a priori* o papel imprescindível que o osso desempenha no corpo humano, são realizados mundialmente cerca de 2,2 milhões de procedimentos ortopédicos por ano, movimentando 2 bilhões de euros anualmente. Deste modo, torna-se imperativo o desenvolvimento de novas terapias que combatam estas limitações.

A engenharia de tecidos revela-se uma aposta promissora nesta área. A sua estratégia consiste no desenvolvimento de um osso novo a partir dos componentes base responsáveis pelo seu crescimento, células, matriz extracelular, interações células-matriz e fatores de crescimento do próprio indivíduo. Desta forma, esta engenharia colmata as limitações associadas às soluções utilizadas na atualidade.

O *scaffold* desempenha uma função muito importante na engenharia de tecidos, sendo responsável pela simulação da estrutura do osso e serve de suporte para o seu crescimento. Após o crescimento do novo osso (entre 3 a 6 meses) a matriz tridimensional será degradada no corpo humano. O compósito constituído por poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) e hidroxiapatite (HA) tem demonstrando boas propriedades mecânicas e biológicas. O PLGA, biopolímero que constitui a matriz polimérica, assegura a biodegradação do *scaffold* e a HA, como reforço, tem como função facilitar a osteocondução. Embora esta combinação ter vindo a apresentar bons resultados, não têm sido analisados num estudo em simultâneo.

A inovação e contributo desta dissertação passa pela produção de nanofibras de PLGA/HA alinhadas através do sistema *electrospinning*, simulando as fibras de colagénio orientadas, que constituem a matriz extracelular do osso nativo. Este trabalho também é inovador quanto à otimização da proporção dos monómeros constituintes do PLGA, bem como dos teores de hidroxiapatite para a utilização como *scaffolds*, em todos os requisitos.

O estudo da proporção relativa aos monómeros (PLA e PGA) constituintes do PLGA revelou que a proporção 85/15 é a que apresenta propriedades mais semelhantes ao do osso nativo, derivado de uma morfologia constituída por fibras alinhadas com um diâmetro de 320nm e porosidade de 87%, assim como um módulo de Young de 0,35GPa. A adição de 1% e 5% de HA ao PLGA revelou uma diminuição da porosidade (de 87% para 80 e 78%) e um aumento do módulo de Young (de 0,35GPa para 2,4 e 2,9GPa). Contudo a adição de 1% de HA ao PLGA demonstrou uma morfologia mais uniforme, com fibras alinhadas e diâmetros 200-300nm. Os resultados *in vitro* demonstraram que a amostra que sugeriu maior osteocondução foi a de PLGA + 1% HA, em relação à de PLGA, pois revelou maior capacidade de absorção do fluido PBS. Após duas semanas de imersão das amostras no fluido PBS, as nanopartículas de HA incorporadas difundiram para a superfície, o que poderá sugerir a bioatividade do *scaffold* pelo corpo, facilitando a reparação óssea. O teste de biodegradação *in vitro* também revelou que os *scaffolds* não demonstram uma perda de massa muito significativa (após duas semanas de imersão), induzindo uma tendência de suporte estrutural ao osso durante o seu tempo de crescimento. Em suma, as nanofibras de PLGA + 1% HA revelam resultados bastante promissores quanto ao uso como *scaffolds*, devido às semelhanças das suas propriedades com as do osso (morfologia de fibras alinhadas de diâmetros entre 50 e 500nm, porosidade de 50 a 90% e módulo de Young de 0,1 a 5GPa).

Abstract

The bone grafts, both allografts and xenografts or even artificial substitutes, are currently surgical interventions performed in injured bones. However, these surgeries have biological limitations associated with an emphasis on diseases transmission and a scarce number of donors. Knowing beforehand, the essential role the bone plays in the human body, approximately 2.2 million orthopaedic procedures are performed a year, amounting to 2 billion euros annually. Thus, it is imperative that new therapies to combat these limitations are developed.

Tissue engineering proves to be a reply promising in this area. Its strategy consists of the development of a new bone from the base components responsible for its growth, cells, extracellular matrix and growth factors. So, this engineering fills the limitations associated to the currently used solutions.

The scaffold plays a very important role in tissue engineering, being responsible for the structure simulation of the bone and its growth. After the growth of the new bone (between 3 to 6 months) the three dimensional matrix will be degraded in the human body. The composite consisting of poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) and hydroxyapatite (HA), has demonstrated good mechanical and biological properties. The PLGA, biopolymer which constitutes the polymeric matrix assures the scaffolds biodegradation and the HA, as a reinforcement, has the function of facilitating osteoconductivity. Although this combination has presented favourable results, they have not been analysed in a simultaneous study.

The innovation and the contribution of this thesis includes the production nanofiber aligned of PLGA / HA through the electrospinning system, simulating the collagen oriented fibres, which constitute the extracellular matrix of the native bone. This study is also innovative regarding the optimum proportion of the constituent monomers of PLGA, as well as the hydroxyapatite percent's added to the matrix for use as scaffolds, in all the demanded areas.

The study of the ratio with regards to the monomers (PLA and PGA) which constitute the PLGA, revealed that the proportion 85/15 is the ratio which demonstrated the more similar properties to the native bone, derived from the aligned fiber morphology with a diameter of 320nm and porosity of 87%, as well as Young's modulus of 0.35GPa. The addition of 1% and 5% of HA to PLGA showed a decrease in porosity (of 87% to 80 and 78%) an increase in Young's modulus (of 0.35GPa to 2.4 and 2.9GPa). However, the addition of 1% HA to PLGA showed a more uniform morphology, and aligned fibers with diameters of 200-300nm. The in vitro biodegradation revealed that the PLGA + 1% HA sample demonstrated greater osteo-conduction, in relation to the PLGA sample, as it showed greater capacity to the PBS fluid absorption. Two weeks after the immersion of the samples in the PBS fluid, HA nanoparticles incorporated to the matrix diffused to the surface, which may promote bioactivity of the scaffold, facilitating bone healing. The in vitro degradation test also revealed that the scaffolds did not demonstrate a very significant weight loss (after two weeks of immersion), inducing a tendency of structural support to the bone during the period of growth. In short, the nanofibers of PLGA + 1% HA sample showed very promising results to apply as scaffolds, due to the similarities of their properties with those of the bone (morphology of nanofibers aligned with diameters between 50 and 500nm, porosity of 50 to 90% and of Young's modulus 0.1 to 5GPa).

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Símbolos e abreviaturas	xiii
1. Enquadramento	1
1.1 Introdução	2
1.2 Estratégia e estrutura da dissertação	4
2. Revisão bibliográfica.....	7
2.1 O osso	8
2.2 Engenharia de tecidos.....	9
2.3 <i>Scaffold</i> para substituir o osso	11
2.3.1 Matriz extracelular.....	11
2.3.2 Requisitos dos <i>scaffolds</i>	12
2.3.3 Materiais utilizados em <i>scaffolds</i>	13
2.3.4 Métodos de fabrico de <i>scaffolds</i>	16
2.4 Referências bibliográficas	21
3. Materiais e Produção dos <i>scaffolds</i>.....	25
3.1 Materiais.....	26
3.2 Produção dos <i>scaffolds</i>	27
3.2.1 Produção das soluções de PLGA	27
3.2.2 Desaglomeração das nanopartículas de HA	28
3.2.3 Produção das soluções de PLGA e HA	29
3.2.4 <i>Electrospinning</i>	30
3.3 Referências bibliográficas	36
4. Caraterização dos <i>scaffolds</i>.....	37
4.1. Técnicas de caraterização	38
4.1.1 Microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de energia dispersiva de raios X.....	38
4.1.2 Análise mecânica dinâmica	39
4.1.3 Difração de raios X.....	40
4.1.4 Calorimetria diferencial de varrimento	42
4.1.5 Teste da gota séssil.....	43

4.2	Teste <i>in vitro</i> de biodegradação	44
4.3	Referências bibliográficas	46
5.	Apresentação e discussão de resultados	47
5.1	Otimização dos parâmetros de <i>electrospinning</i>	48
5.2	Caraterização dos <i>scaffolds</i> de PLGA	57
5.2.1	Caraterização morfológica	57
5.2.2	Caraterização mecânica	63
5.3	Desaglomeração das nanopartículas de HA	66
5.4	Caraterização dos <i>scaffolds</i> de PLGA/HA	68
5.4.1	Caraterização morfológica	68
5.4.2	Caraterização mecânica	73
5.4.3	Caraterização estrutural	74
5.4.4	Caraterização térmica	76
5.4.5	Caraterização superficial	77
5.4.6	Teste <i>in vitro</i> de biodegradação	79
5.5	Referências bibliográficas	85
6.	Conclusão	89
7.	Proposta para trabalhos futuros	89
	Anexo I: Composição química do PBS	91
	Anexo II: Micrografias SEM com uma ampliação de 1000x para quatro tempos de imersão (1h30m, 2h, 3h e 6h) das nanopartículas de HA da solução HFP e 5% de HA	94

Índice de figuras

Figura 1.1- Fluxograma da estratégia de trabalho utilizada para a presente dissertação	4
Figura 2.1- Ilustração osso humano [5]	8
Figura 2.2- Princípio básico da engenharia de tecidos [11]	10
Figura 2.3- Ilustração da matriz extracelular [17]	12
Figura 2.4- Representação da técnica de <i>electrospinning</i> [41, 12].....	18
Figura 2.5- Representação dos diferentes coletores da técnica de <i>electrospinning</i> : a) coletor plano, b) coletor cilíndrico rotativo, c) coletor cilíndrico constituído por fios, d) coletor cilíndrico com fio enrolado sobre a superfície e e) coletor de disco [34]	20
Figura 3.1- Sistema de desaglomeração das nanopartículas de HA, destacando a sonda e a solução	28
Figura 3.2- Sistema <i>electrospinning</i> NaBond NEU-01.....	30
Figura 4.1- Esquema representativo das técnicas utilizadas para a caracterização dos <i>scaffolds</i>	38
Figura 4.2- Representação do fenómeno da difração de raios X [5]	41
Figura 4.3- Esquema representativo do ângulo de contacto formado entre um líquido e uma superfície sólida [9]	43
Figura 4.4- Esquema representativo da relação entre o ângulo de contacto e a molhabilidade [10].....	44
Figura 5.1- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x e gráfico de distribuição de diâmetros das amostras produzidas por <i>electrospinning</i> com uma taxa de fluxo de 0,5ml/h, uma velocidade de rotação de 4000rpm, uma distância entre o coletor e a agulha de 10cm e um campo elétrico (E) variável PVA1) E= 18kV, PVA2) E= 20kV, PVA3) E= 23kV e PVA4) E= 26kV	49
Figura 5.2- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x e gráfico de distribuição de diâmetros das amostras produzidas por <i>electrospinning</i> com uma taxa de fluxo de 0,5ml/h, uma velocidade de rotação de 4000rpm, um campo elétrico de 23kV e a distância entre o coletor e a extremidade da agulha (d) variável PVA3) d= 10cm, PVA5) d= 13cm, PVA6) d= 16cm e PVA7) d= 20cm	51
Figura 5.3- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x e gráfico de distribuição de diâmetros das amostras produzidas por <i>electrospinning</i> com uma velocidade de rotação de 4000rpm, uma distância entre o coletor e a agulha de 10cm, um campo elétrico de 23kV e uma taxa de fluxo (TF) variável PVA3) TF= 0,5ml/h, PVA8) TF= 1,5ml/h, PVA9) TF= 2,5ml/h e PVA10) TF= 3,5ml/h.....	53
Figura 5.4- Micrografias SEM a uma ampliação de 500x e 2000x das bolhas das amostras PVA8), PVA9) e PVA10)	54
Figura 5.5- Micrografias SEM a uma ampliação de 2000x e 35000x e gráfico de distribuição de diâmetros para as amostras produzidas por <i>electrospinning</i> com uma taxa de fluxo da solução de 0,5ml/h, um campo elétrico de 23kV, uma distância entre o coletor e a extremidade da agulha de 10cm e uma velocidade de rotação do coletor (v) variável PVA11) v= 900rpm, PVA12) v= 1900rpm, PVA13) v= 3400rpm e PVA3) v= 4000rpm.....	55
Figura 5.6- Micrografias SEM com uma ampliação de 500x para a amostra produzida por <i>electrospinning</i> na zona do coletor a) com fio de cobre e b) sem fio de cobre	56
Figura 5.7- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x das amostras de PLGA 85/15.....	58
Figura 5.8- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x das amostras de PLGA 75/25.....	61

Figura 5.9- Gráficos de distribuição de diâmetros para a) amostra 4 de PLGA 85/15, b) amostra 10 de PLGA 75/25	62
Figura 5.10- Amostra colocada entre as amarras no equipamento de DMA	64
Figura 5.11- Micrografias SEM em secção transversal com uma ampliação de 3500x da amostra 4 de PLGA 85/15	64
Figura 5.12- Gráfico da variação do módulo de armazenamento com a frequência aplicada para a amostra 4 de PLGA 85/15 e a amostra 10 de PLGA 75/25	65
Figura 5.13- Micrografias SEM com uma ampliação de 1000x dos vários tempos de desaglomeração das nanopartículas de HA da solução HFP e 1% de HA e sendo a última micrografia SEM com uma ampliação de 5000x a 6h de desaglomeração das nanopartículas de HA da solução HFP e 1% de HA.....	67
Figura 5.14- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x das amostras de PLGA 85/15 com a adição de 1% HA.....	69
Figura 5.15- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x das amostras de PLGA 85/15 com a adição de 5% de HA	71
Figura 5.16- Gráficos de distribuição de diâmetros para a) amostra 13 (PLGA 85/15 + 1% HA), b) amostra 15 (PLGA 85/15 + 5% HA)	72
Figura 5.17- Gráfico da variação do módulo de armazenamento com a frequência aplicada para as amostras de PLGA 85/15 e PLGA 85/15 com a adição de 1% e 5% de HA.....	73
Figura 5.18- Difratogramas referentes ao PLGA 85/15 puro, à amostra de <i>scaffold</i> de PLGA 85/15, à HA pura e às amostras de <i>scaffolds</i> de PLGA 85/15 com a adição de 1% e 5% de HA.....	75
Figura 5.19- Termogramas DSC e respectiva temperatura transição vítrea para as amostras de PLGA 85/15 com 0%, 1% e 5% de HA	76
Figura 5.20- Gráfico de ângulos de contacto com água destilada para as amostras de <i>scaffolds</i> de PLGA com 0%, 1% e 5% de HA (esquerda) e imagem obtida pelo <i>software</i> de uma medição do ângulo de contacto da amostra de <i>scaffolds</i> de PLGA com 0% de HA (direita)	78
Figura 5.21- Percentagem de absorção do PBS pelos <i>scaffolds</i> de PLGA 85/15 e de PLGA 85/15 + 1% HA ..80	
Figura 5.22- Efeito da degradação da massa dos <i>scaffolds</i> de PLGA 85/15 e de PLGA 85/15 + 1% HA	80
Figura 5.23- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e de 35000x dos <i>scaffolds</i> de PLGA (esquerda) e PLGA + 1% de HA (direita) antes de imersão e após 3 dias, 1 semana, 10 dias e 2 semanas de imersão do PBS	83
Figura 5.24- Micrografia SEM com uma ampliação de 5000x da amostra de PLGA com a adição de 1% de HA após 2 semanas de imersão do PBS e espectros de EDS e respetivas tabelas com as percentagens atômicas correspondentes à zona da amostra selecionada.....	84

Índice de tabelas

Tabela 2.1- Propriedades do osso humano [4].....	9
Tabela 3.1- Proporções do polímero poli (lático-co-glicólico) [1].....	26
Tabela 3.2- Soluções e respectivas concentrações utilizadas para a produção nanofibras de PLGA 85/15	27
Tabela 3.3- Soluções e respectivas concentrações utilizadas para a produção nanofibras de PLGA 75/25	27
Tabela 3.4 - Soluções e respectivas concentrações utilizadas para a produção nanofibras de PLGA 85/15 com adição de diferentes percentagens de HA	29
Tabela 3.5- Parâmetros de processo de <i>electrospinning</i> utilizados para cada amostra de PVA para a otimização de parâmetros de processo.....	33
Tabela 3.6- Parâmetros do processo <i>electrospinning</i> utilizados para a produção das amostras de PLGA 85/15	34
Tabela 3.7- Parâmetros do processo <i>electrospinning</i> utilizados para a produção das amostras de PLGA 75/25	34
Tabela 3.8- Medidas de tensão superficial para a solução de PLGA 85/15 e para cada solução de PLGA 85/15 + HA.....	35
Tabela 3.9- Parâmetros do processo de <i>electrospinning</i> utilizados para a produção das amostras de PLGA 85/15 com adição de diferentes percentagens de HA	35
Tabela 5.1- Concentração das soluções e parâmetros do processo <i>electrospinning</i> utilizados para a produção das amostras de <i>scaffolds</i> de PLGA 85/15.....	58
Tabela 5.2- Concentração das soluções e parâmetros do processo <i>electrospinning</i> utilizados para a produção das amostras de <i>scaffolds</i> de PLGA 75/25.....	60
Tabela 5.3- Valores utilizados para o cálculo da densidade aparente e a respetiva porosidade para as amostras 4 de PLGA 85/15 e amostra 10 de PLGA 75/25	63
Tabela 5.4- Concentração das soluções e parâmetros do processo <i>electrospinning</i> utilizados para a produção das amostras de <i>scaffolds</i> de PLGA 85/15 com a adição de diferentes percentagens de HA.....	69
Tabela 5.5- Valores utilizados para o cálculo da densidade aparente e a respetiva porosidade para as amostras de PLGA 85/15 e PLGA 85/15 com a adição de 1% e 5% de HA	72

Símbolos e abreviaturas

°C- Grau celsius

μm- micrómetro

μl- microlitro

Å- Angström

β-TCP- beta fosfato de cálcio

Au- ouro

C- carbono

CC- corrente continua

cm- centímetro

DMA- *Dynamic Mechanical Analysis*

DSC- *Differential Scanning Calorimetry*

DTMA- *Dynamic Mechanical Thermal Analysis*

EDS- *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*

eV- elétron volt

g- grama

GPa- gigapascal

h- horas

H₂- Hidrogénio

HA- Hidroxiapatite

HFP- 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol

Hz- hertz

I&DT- Investigação e desenvolvimento tecnológico

kV- kilovolt

LED&MAT- Laboratório de Ensaaios, Desgaste e Materiais

mg- miligrama

min- minuto

ml- mililitro

mm- milímetro

MPa- megapascal

N- Newton

NH₃- Amoníaco

nm- nanómetro

PBS- *Phosphate buffered saline*

FDA- *Food and Drug Administration*

PGA- Poli (ácido glicólico)

PLA- Poli (ácido láctico)

PLGA- Poli (láctido-co-glicólido)

PVA- Acetato de Polivinila

rpm- rotações por minuto

SEM- *Scanning Electron Microscopy*

SEMAT- Laboratório de Serviços de Caraterização de Materiais

Tg- Temperatura de transição vítrea

XRD- *X-ray Diffraction*

Capítulo 1

Enquadramento

1.1 Introdução

O osso é o constituinte principal do esqueleto humano, sendo este encarregue de sustentar a estrutura do corpo humano. Para além deste papel, também é responsável pela proteção dos órgãos, sustentação dos músculos esqueléticos e funciona como reservatório de cálcio e fósforo. Assim sendo, quando o osso é lesionado, leva a mudanças drásticas na qualidade de vida do ser humano. Tarefas básicas, como caminhar e movimentar os braços, ou até realizar as tarefas elementares diárias do ser humano (higiene, etc.), etc. ficam limitadas, sendo que tipicamente estas limitações podem também provocar problemas psicológicos.

Atualmente as soluções para este problema consistem em enxertos ósseos (aloenxertos, xenoenxertos) ou substitutos artificiais. Mundialmente são realizados anualmente cerca de 2,2 milhões¹ de procedimentos ortopédicos, movimentando neste mercado aproximadamente 2 bilhões de euros por ano¹. Esses procedimentos garantem a consolidação óssea adequada para muitos problemas ósseos, tais como fraturas ou doenças (infecções e tumores). No entanto, estes procedimentos ainda apresentam limitações biológicas. Além do número de doadores ser escasso, os enxertos podem transmitir patologias. O mesmo acontece com os substitutos artificiais que não possuem características semelhantes ao osso. As limitações anteriormente referidas impulsionam à necessidade de desenvolver novas terapias utilizando conceitos alternativos, sendo este um tema central de I&DT na atualidade.

O osso possui uma capacidade intrínseca notável de regeneração, mas esta capacidade não responde a danos graves como perda óssea ou traumas graves. Neste âmbito, a engenharia de tecidos é uma resposta promissora com grande potencial terapêutico. O seu princípio básico consiste no desenvolvimento de um osso novo a partir dos seus componentes base necessários para o seu crescimento, células, matriz extracelular, interações células-matriz e fatores de crescimento. Deste modo, esta estratégia não demonstra as limitações supracitadas, o que permite responder às necessidades do consumidor, através de avanços tecnológicos por substitutos funcionais. No entanto, os componentes mencionados não são os únicos necessários para o crescimento ósseo. O osso possui uma estrutura tridimensional, e as células não crescem de forma 3D. Por esta razão, é necessária uma estrutura 3D de modo a simular a estrutura do osso e permitir o seu crescimento funcionando como suporte do mesmo. Em suma, a estratégia utilizada conjuga o cultivo e proliferação das células ósseas com recurso a uma matriz tridimensional (*scaffold*) de suporte. Esta matriz será depois implantada na zona do defeito ósseo de forma induzir a regeneração e reparação óssea. As células implantadas irão sintetizar a matriz extracelular do novo tecido ósseo, e o

¹ K. U. Lewandrowski, J. D. Gresser, D. L. Wise, and D. J. Trantol, "Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 757-64, 2000.

scaffold tem como função fornecer o suporte mecânico do osso assim como permitir a proliferação das células. Após a formação do tecido novo a matriz tridimensional será degradada no corpo humano.

Os *scaffolds* desempenham um papel muito importante na engenharia de tecidos. Assim, possuem requisitos bastante rigorosos. A escolha do seu material de base é um passo determinante, uma vez que as suas propriedades vão determinar o desempenho da regeneração óssea. Por este motivo, o *scaffold* terá de ser biodegradável, biocompatível e terá de possuir propriedades mecânicas semelhantes à matriz extracelular do osso nativo. Para além da escolha do material, o processo de fabrico também é determinante visto que controla a morfologia da matriz tridimensional.

Em colaboração com o Instituto Pedro Nunes em Coimbra, o principal objetivo desta dissertação consiste na produção de *scaffolds* para reparar, substituir e construir o osso com a estratégia de engenharia de tecidos. Posto isto, os *scaffolds* serão constituídos por nanofibras do compósito PLGA e HA e serão produzidos pela técnica de *electrospinning*. Para que o *scaffold* forneça temporariamente o suporte necessário para as células é necessário que estes possuam uma morfologia e propriedades mecânicas semelhantes ao do osso nativo a ser substituído mas também que permitam a proliferação e crescimento das células ósseas.

1.2 Estratégia e estrutura da dissertação

A produção de *scaffolds* para reparar, substituir e construir o osso em engenharia de tecidos é o objetivo primordial desta dissertação. Neste sentido, com a finalidade de atingir o objetivo referido, o presente trabalho utilizou como estratégia de trabalho a execução de duas etapas essenciais, como demonstrado no fluxograma da Figura 1.1.

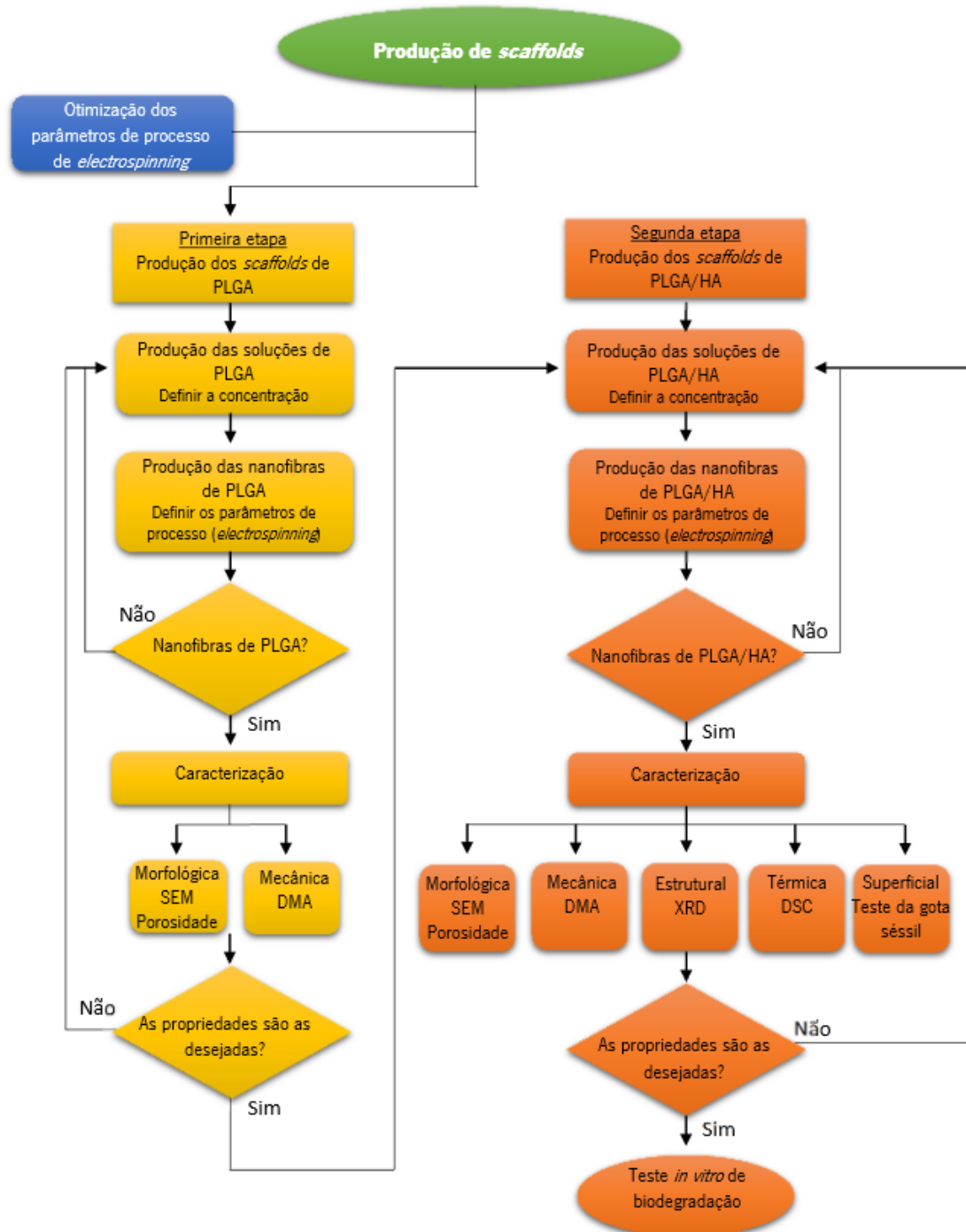


Figura 1.1- Fluxograma da estratégia de trabalho utilizada para a presente dissertação

Como demonstrado na Figura 1.1, previamente à produção dos *scaffolds* realizou-se um estudo de otimização dos parâmetros de processo do sistema *electrospinning*. O objetivo deste estudo centrasse na avaliação da influência destes parâmetros na morfologia das fibras. Para este estudo foram produzidas fibras de PVA, pois este estava disponível em quantidades mais elevadas, onde se fizeram variar alguns parâmetros como: campo elétrico, distância entre o coletor e a agulha, taxa de fluxo, velocidade de rotação do coletor e o tipo de coletor.

De seguida procedeu-se à produção dos *scaffolds* de PLGA, sendo esta a primeira etapa determinante para o presente trabalho. Todo o procedimento relativo à primeira etapa, demonstrado na Figura 1.1, foi realizado para as duas proporções dos monómeros de PLGA estudadas, PLGA 85/15 e PLGA 75/25. Os resultados das caracterizações dos *scaffolds* relativos a cada proporção do polímero estudado, é que permitiram definir o polímero a utilizar na segunda etapa da dissertação (produção dos *scaffolds* de PLGA/HA).

O procedimento realizado para a segunda etapa do presente trabalho demonstrado na Figura 1.1, foi realizado para duas percentagens de HA adicionadas ao polímero PLGA, 1% e 5%. O teste *in vitro* de biodegradação foi realizado apenas para a amostra que revelou propriedades, obtidas pelas caracterizações realizadas, promissoras para a utilização como *scaffolds*.

A estrutura da dissertação teve por base a estratégia de trabalho utilizada. No capítulo 1 é realizado o enquadramento da dissertação. Onde é feita uma pequena introdução, referindo qual o problema, qual a solução e quais os objetivos do trabalho. De seguida é referida a estratégia de trabalho assim como a estrutura da dissertação utilizada.

O capítulo 2 é dedicado à revisão bibliográfica relativa ao estudo da anatomia do osso, e da estratégia utilizada pela engenharia de tecidos. Do que engloba esta engenharia, neste capítulo destacam-se os requisitos para a produção dos *scaffolds* assim como os materiais utilizados e os tipos de métodos utilizados para a produção de nanofibras utilizadas como *scaffolds*, com especial foco no sistema *electrospinning*.

O capítulo 3 retrata os materiais utilizados nesta dissertação para a produção dos *scaffolds* assim como a sua produção. Quanto ao processo de produção dos *scaffolds* é evidenciada a produção das soluções, a estratégia utilizada para a desaglomeração das nanopartículas de hidroxiapatite assim como a descrição do procedimento de produção dos *scaffolds* por *electrospinning*, sendo indispensável a descrição dos parâmetros de processamento utilizados.

No capítulo 4 é elaborada uma descrição sumária de todas as técnicas de caracterização utilizadas no presente trabalho com o intuito de estudar as propriedades dos *scaffolds* após a sua produção assim como

definir a composição do material que apresenta melhores propriedades para a aplicação em estudo. É também descrita a componente experimental relacionada com o teste *in vitro* de biodegradação.

No capítulo 5 estão apresentados e discutidos todos os resultados divididos em cinco secções. Na primeira é estudado a etapa de otimização dos parâmetros de processo de *electrospinning*, sublinhando a influência dos parâmetros no diâmetro e no alinhamento das fibras. A segunda tem como intuito analisar os *scaffolds* constituídos por PLGA a nível morfológico e estrutural. A terceira e a quarta secções estão intimamente relacionadas, sendo que terceira estuda o melhor procedimento para a produção das soluções relativas aos *scaffolds* de PLGA/HA e a quarta avalia estes mesmo *scaffolds* a nível morfológico, mecânico, estrutural, térmico e superficial. A última secção avalia o comportamento de biodegradabilidade dos *scaffolds* de PLGA/HA obtido pelo teste *in vitro* de biodegradação realizado nesta dissertação.

No capítulo 6 estão apresentadas as conclusões sucintas relativas a todo o desenvolvimento deste trabalho, desde a produção de todos os *scaffolds*, e o estudo das suas propriedades até aos resultados do teste *in vitro*. E por fim o capítulo 7 apresenta algumas propostas para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

2.1 O osso

O osso é uma estrutura formada por tecido ósseo, caracterizado por um órgão esbranquiçado e duro que se une por articulações de modo a formar o esqueleto do corpo. Este órgão tem um papel fundamental no corpo humano fornecendo a estrutura e o suporte [1]. O osso exerce cinco funções principais, sustentar o tórax e as extremidades; estimular a função locomotora dos músculos esqueléticos; proteger as vísceras vulneráveis; fornecer as células encontradas na medula que se diferenciam em células do sangue e atuar como reservatório de cálcio e fósforo [1-3].

Para o osso estar em conformidade com as suas funções, tem que estar em constante regeneração, por isso é constituído por uma matriz complexa de material compósito. Sendo caracterizado por cerca de 30% de matriz orgânica, composta pela matriz extracelular, e 70% de matriz inorgânica [4]. A sua matriz orgânica, responsável pela tenacidade e pelas propriedades viscoelásticas, é constituída por fibras orgânicas de colagénio tipo 1. Dentro desta rede orgânica estão integrados nanocristais inorgânicos de hidroxiapatite, constituídos por cálcio e fósforo [1, 3], responsáveis pela dureza. O colagénio possui um módulo de Young de 1-2GPa e uma resistência à tração de 50-1000MPa, demonstrando assim não ter influência nas propriedades mecânicas do osso, já a hidroxiapatite possui um módulo de Young de 130GPa e uma resistência à tração de 100MPa [3]. No entanto o osso também possui tecido vivo, constituído cerca de 15% da sua matriz orgânica, contendo três tipos de células, osteócitos, osteoblastos e osteoclastos [4]. Cada célula desempenha uma função e todas elas contribuem para um tecido ósseo saudável.

O osso é constituído por dois tipos de arquitetura: osso cortical, também conhecido por osso compacto, e por osso trabecular ou esponjoso, como representado na Figura 2.1.



Figura 2.1- Ilustração osso humano [5]

O osso compacto é a superfície densa exterior do osso, constituindo 80% da massa óssea total [2-4, 6]. O osso esponjoso é o interior do osso humano, com uma maior área de superfície, menos densa, mais fraca

e menos rígida. A sua baixa rigidez e densidade devem-se à sua elevada porosidade [3, 6]. Devido às estruturas diferenciadas destes ossos, as suas propriedades mecânicas são distintas, como demonstrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1- Propriedades do osso humano [4]

Osso	Resistência à compressão (MPa)	Resistência à flexão/ tração (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Tenacidade ($\frac{MPa}{m^2}$)	Porosidade (%)
Compacto	8 – 230	50 – 150	7 – 30	2 – 12	5 – 10
Esponjoso	2 – 12	10 – 20	0,1 – 5	0,1 – 0,8	50 – 90

O osso tem capacidade intrínseca de autorregenerar, mas ao longo do tempo e em situações em que o defeito ósseo é grave (infecções, tumores e perdas ósseas por trauma), esta capacidade pode não ser suficiente e como tal, pode não ocorrer reparação do defeito ósseo. Atualmente as soluções para estas necessidades são enxertos (aloenxertos, xenoenxertos) ou substitutos artificiais. Contudo, estas soluções apresentam algumas limitações, tais como os enxertos estão associados à escassez de dadores assim como também o risco de transmissão de doenças e os substitutos artificiais não possuem as características mecânicas do osso. Deste modo, a pesquisa recente tem sido dedicada à engenharia de tecidos como forma de solucionar estas limitações [3, 6, 7].

2.2 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é uma disciplina da área da ciência biomédica e foi falada pela primeira vez por Vacanti e Langer's como uma medicina regenerativa, em 1993 [8]. Engenharia de tecidos é uma ciência aplicada que utiliza conhecimentos interdisciplinares para desenvolver tecidos artificiais. Baseada em conhecimentos das áreas da ciência e engenharia de materiais, biológica e médica, esta tecnologia permite substituir, reparar, reconstruir tecidos ou órgãos danificados devido a acidentes ou doenças graves [9, 10]. Além da regeneração de tecidos ou órgãos, esta engenharia também pode ser utilizada para fins de diagnósticos e pesquisas terapêuticas.

O princípio básico da produção do tecido artificial caracteriza-se pela expansão *in vitro* de células viáveis do paciente, como representado na Figura 2.2. Desta forma, primeiramente é recrutado um número de células ao paciente para, posteriormente serem cultivadas e proliferadas. Após a proliferação e o cultivo das células

em laboratório, estas serão cultivadas em suportes tridimensionais conhecidos como *scaffolds*. De seguida as células criam um tecido vivo que pode ser usado como tecido substituto a ser reimplantado no sítio defeituoso no paciente. Em última instância, o *scaffold* degrada-se enquanto o novo órgão ou tecido é formado, prevenindo o risco de ocorrer rejeição dos tecidos, a longo prazo, devido à presença de um material estranho no corpo [10].

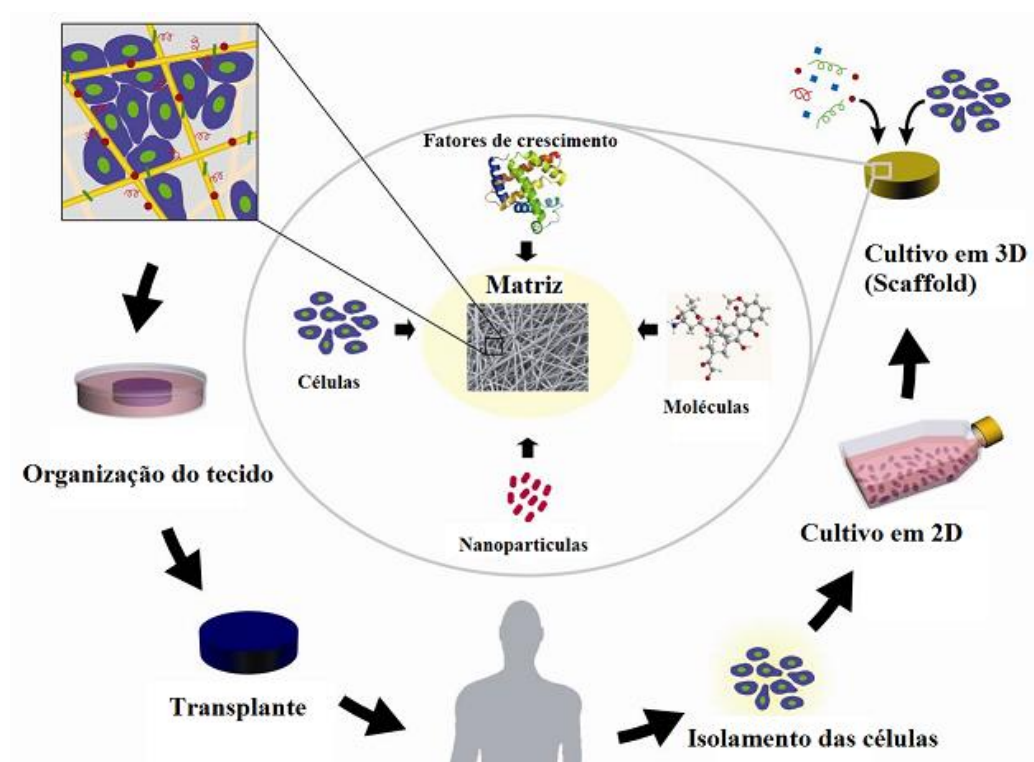


Figura 2.2- Princípio básico da engenharia de tecidos [11]

A formação do tecido artificial pode ocorrer em dois tipos de ambiente, *in vitro* e *in vivo* [12]. Num ambiente *in vitro* o tecido é primeiramente criado num ambiente com condições controladas para o crescimento celular (bioreator) e após o seu crescimento, o tecido é implantado no paciente. O crescimento *in vivo* caracteriza-se pela implantação do *scaffold* no local onde ocorreu a lesão e aproveitando a capacidade de regeneração do corpo, o defeito existente no paciente é corrigido [12]. A cada um dos ambientes estão associadas vantagens: a formação do tecido *in vivo* é incentivada pelo corpo do paciente, por outro lado num ambiente *in vitro* todo o processo pode ser facilmente controlado e manipulado [12].

Devido à complexidade do corpo humano, para além de aplicações ortopédicas, existe um vasto leque de aplicações onde a engenharia de tecidos pode ser aplicada. Nomeadamente, na construção de novos órgãos no sistema vascular (vasos sanguíneos e artérias), respiratório (pulmões) e urinário (bexiga e uretra) [1, 9, 10, 13].

2.3 Scaffold para substituir o osso

O *scaffold* é o componente mais importante da engenharia de tecidos, sendo caracterizado por um suporte tridimensional, desempenhando um papel muito importante no desenvolvimento do novo tecido quer seja *in vitro* ou *in vivo*. O seu objetivo é suportar física e mecanicamente as células, desde a sua injeção até ao implante no organismo do paciente. Deste modo, pretende-se que o *scaffold* seja semelhante à matriz extracelular do osso de forma a sustentar o crescimento e a proliferação das células, assim como fornecer estrutura mecânica ao osso, até à formação do novo tecido [1, 9, 10, 13].

2.3.1 Matriz extracelular

O tecido humano na sua constituição integra dois componentes principais, as células, que têm como funções regular os processos do corpo mantendo assim o seu desempenho normal e cicatrizar as feridas; e a matriz extracelular, que tem como função principal fornecer a estrutura do corpo [14]. A matriz extracelular faz parte da maior parte do volume do tecido ósseo, caracterizando-se como uma rede tridimensional de poros interconectados de macromoléculas e de proteínas, sendo devido a estes componentes que ocorrem as interações entre células [13]. Com a variação da proporção de cada componente, as funções e as características da matriz vão variar dando origem à produção de diferentes tipos de matrizes [14, 15]. Assim, quanto maior a percentagem de cálcio maior a rigidez da matriz (como acontece na matriz óssea) e quanto maior a percentagem de polissacarídeos, maior a flexibilidade da matriz (como verificado na matriz cartilágnea).

O papel das fibras de colagénio na estrutura complexa da matriz extracelular é fornecer a resistência ao tecido e ainda mais relevante é proporcionar a interação entre as células e a matriz. As fibras de colagénio fornecem uma geometria única, consistindo em fibras com diâmetros entre 50 a 500nm muito organizadas como demonstrado na Figura 2.3. Esta organização advém das propriedades inatas das suas moléculas e também da atividade das células [14].



Figura 2.3- Ilustração da matriz extracelular [17]

A matriz extracelular tem como principais funções [14, 16]:

- Fornecer suporte estrutural e ambiente físico para as células crescerem, migrarem e responderem aos estímulos;
- Fornecer estrutura e propriedades mecânicas, como rigidez e elasticidade, associadas às funções do tecido ósseo;
- Fornecer um ambiente bioativo, de forma a permitir a proliferação, crescimento, sobrevivência, migração e diferenciação celular;
- Permitir a interação com a superfície celular;
- Atuar como reservatório para fatores de crescimento e uma grande variedade de biomoléculas, permitindo assim a regeneração do tecido ósseo.

Tendo por base as principais funções desempenhas pela matriz extracelular, torna-se imperioso assemelhar as propriedades dos *scaffolds* à matriz extracelular. Atualmente tem-se demonstrado especial interesse nesta área, tendo como finalidade melhorar o conceito da engenharia de tecidos. Contudo para que os *scaffolds* possuam propriedades semelhantes à matriz extracelular estes têm que obedecer a alguns requisitos.

2.3.2 Requisitos dos *scaffolds*

O bom desempenho da engenharia de tecidos está linearmente dependente das propriedades do material base do *scaffold*. Contudo, ainda não existe consenso entre a comunidade científica sobre estas características. Estes requisitos dependem principalmente do tecido a ser restaurado e do tamanho do defeito, porém existem características gerais comuns ao desenvolvimento do *scaffold*.

A biocompatibilidade é essencial para que a implantação da matriz tridimensional no paciente não tenha uma resposta imune [1, 18]. As propriedades mecânicas da matriz devem ser semelhantes às do osso

vivo, de modo a que esta responda às tensões contínuas a que o osso irá estar sujeito. A biodegradabilidade do *scaffold* tem um papel fundamental na prevenção de situações que possam ocorrer, a longo prazo, pela presença de um material estranho no corpo do paciente. A taxa de degradação deve ser proporcional à taxa de crescimento do novo tecido, tendo sempre em consideração que as propriedades mecânicas diminuem com a degradação [4]. A bioatividade, com o objetivo de regular as reações biológicas, é também uma outra propriedade importante pois proporciona a interação entre os biomateriais do *scaffold* e os componentes celulares do osso [16].

Para além destas propriedades, a geometria do *scaffold* também é determinante. A matriz tridimensional deve possuir uma geometria de poros abertos interconectados numa estrutura bastante porosa com uma elevada razão área/volume, permitindo desta forma o crescimento das células e uma distribuição uniforme na sua estrutura. A porosidade e a interconetividade são também importantes para permitir uma melhor difusão de nutrientes e gases, assim como para a remoção de resíduos metabólicos resultantes da atividade celular [4]. No entanto, o grau de porosidade influencia as propriedades mecânicas, deste modo o grau de porosidade dos *scaffolds* deve ser equilibrado [4]. O tamanho dos poros também define o desempenho do *scaffold*, se este tamanho for muito reduzido poderá acontecer oclusão dos poros pelas células. Klawitter J. [19] afirma que o tamanho das células, a migração requerida destas e o transporte do fluido definem que o tamanho dos poros deve ser aproximadamente 100-150 μm . No entanto, estes podem ser inferiores se a área de superfície dos *scaffolds* for elevada [20, 21] .

As propriedades químicas de superfície também podem controlar e afetar a adesão e proliferação das células, pois são estas que ditam a capacidade das células aderirem ao material [4]. O *scaffold* também terá de ser de fácil esterilização, sendo imperativo que as suas propriedades de superfície permaneçam inalteradas após a execução deste processo pois antes de ser implantado terá de ser sujeito a uma esterilização [22].

2.3.3 Materiais utilizados em *scaffolds*

A seleção do material adequado para a produção do *scaffold* para aplicações de engenharia de tecidos ósseos é um passo muito importante, uma vez que as suas propriedades vão determinar o seu bom desempenho, como referido anteriormente. Os materiais propostos até à data são cerâmicos e polímeros, tanto sintéticos como naturais, ou até mesmo compósitos [4]. No entanto, grande parte dos materiais cerâmicos não são biodegradáveis, deste modo a panóplia de escolha reduz-se substancialmente [3, 4].

Os cerâmicos têm sido usados em grande escala na regeneração de tecido ósseo. A sua origem pode ser natural, como por exemplo hidroxiapatite coralina, ou de origem sintética, como por exemplo hidroxiapatite

e β -fosfato de tricálcio. Vários autores [23-25] afirmam que estes materiais demonstram bons resultados para regeneração óssea, uma vez que possuem constituintes do osso. No entanto, também revelam limitações quanto à sua fragilidade e estabilidade mecânica, impedindo a sua utilização em defeitos ósseos graves.

Em alternativa a estes materiais, existem os polímeros biodegradáveis tanto naturais como sintéticos. Estes materiais têm sido alvo de grande investigação para aplicações de reconstrução óssea [4]. Os polímeros naturais são obtidos por fontes de origem animal ou vegetal, o colagénio, fibrinogénio, quitosano e ácido hialurónico, são alguns exemplos destes polímeros. Estes materiais possuem várias vantagens como a bioatividade, ou seja têm capacidade de participar em reações biológicas [26]. No entanto, a sua forte resposta autoimune possui uma complexidade associada com a purificação e a possibilidade de transmissão de doenças [27]. Os polímeros sintéticos são comumente usados na área da biomédica, sendo que os mais utilizados são os poliésteres alifáticos saturados, poli(α -hidróxi ácidos), poli(propileno fumarato), policarbonatos e poli(anidridos). Estes materiais são biologicamente inertes e a sua versatilidade química varia de acordo com a sua natureza [4, 28]. Apesar destas vantagens, estes não possuem sinais de reconhecimento de células e as suas propriedades hidrofóbicas dificultam o cultivo destas [29].

Deste modo, o uso de materiais compósitos pode ser benéfico combinando as boas propriedades dos materiais cerâmicos e dos materiais poliméricos.

2.3.3.1 Materiais Compósitos

Entre outros autores, Dietmar Werner Hutmacher [3], propõe o uso de materiais compósitos para a produção dos *scaffolds*. Este autor revela que a combinação dos cerâmicos bioativos, tal como os fosfatos de cálcio, com os polímeros biodegradáveis melhora as propriedades mecânicas dos *scaffolds*. D. Hutmacher [3], também afirma que a combinação destes materiais melhora as propriedades osteocondutivas do *scaffold*. Têm sido investigados muitos compósitos como polímeros sintéticos em combinação com hidroxiapatite (HA) e beta fosfato de cálcio (β -TCP) [3, 4]. Os estudos da adição de HA e β -TCP aos polímeros biodegradáveis poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido glicólico) (PGA) são os mais promissores devido às propriedades semelhantes ao osso nativo dos fosfatos de cálcio e à boa biodegradabilidade dos polímeros [3].

Para o presente trabalho será estudado o compósito de hidroxiapatite e o polímero poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), sendo que este é sintetizado através do PLA e PGA.

a) Compósito poli(láctido-co-glicólido) e hidroxiapatite

O poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) é um copolímero que devido às suas propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico [27]. PLGA é sintetizado por dois tipos diferentes de monómeros (ácido láctico e ácido glicólico) ligados entre si por ligações éster. A sua degradação ocorre por hidrólise das ligações éster e os produtos derivados da degradação são eliminados do corpo pela libertação de dióxido de carbono e água [27, 28]. Uma das vantagens da utilização deste polímero comparativamente com os outros, é a possibilidade de se poder variar o tempo de degradação, e consequentemente as propriedades mecânicas, pois estas são determinadas pela proporção dos monómeros adicionados na sua produção [2]. Sabe-se pela literatura [27] que quanto maior for o teor de ácido glicólico, menor o tempo de degradação. Todas as suas proporções, o polímero apresenta um comportamento amorfo e com uma temperatura de transição vítrea de 40-60°C [27].

A hidroxiapatite (HA) é um cerâmico de fosfato de cálcio que tem como fórmula química $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, constituído por uma razão de Ca/P de 1,67 [3]. Este fosfato de cálcio é o constituinte mineral do osso que representa 70% da massa dos ossos e dentes, facilitando a biocompatibilidade e osteocondução dos biomateriais. Para além destas propriedades, o facto deste cerâmico adsorver moléculas fazem da hidroxiapatite um excelente material para reparação óssea [3]. A hidroxiapatite possui uma cristalinidade elevada, garantindo assim uma taxa de degradação lenta quando utilizada como *scaffold*, o que assegura a sua forma geométrica durante a regeneração do tecido ósseo [30, 31]. Quando este material é sujeito a temperaturas elevadas, pode dar origem a outras fases α e β -TCP. O estudo de difração de raios-X deste material revela que a transformação de HA para β e desta para α ocorre a temperaturas superiores a 1200°C [31]. K. Rezwan [32] revela que todas as fases proporcionam boa proliferação e crescimento de células, no entanto a mais eficiente neste contexto é a HA devido à sua similaridade com a parte mineral do osso.

De acordo com Lihong Lao [7], o uso do compósito PLGA/HA para *scaffold* produzido por *electrospinning* ajuda a proliferação e adesão das células, verificado *in vitro* através da cultura de osteoblastos. Para este estudo foram preparados compósitos com diferentes percentagens de hidroxiapatite, onde se verificou que com o aumento da concentração de HA ocorre aglomeração, a uma concentração inferior a 50% de HA, este fica uniformemente disperso na matriz. A aglomeração é prejudicial, pois provoca um aumento do diâmetro e induz a quebra/rotura dos *scaffolds*.

Jose V. Moncy [33] estudou as propriedades mecânicas dos *scaffolds* constituídos por PLGA/HA produzidos por *electrospinning*. Este estudo revelou que estes *scaffolds* produzidos pela adição de 5% de HA ao PGLA (85/15) demonstram propriedades mecânicas semelhantes às do osso esponjoso. O módulo de Young

obtido foi de 441MPa o que se encontra entre os parâmetros do osso esponjoso referido na Tabela 1 da secção 2.1.

A incorporação de hidroxiapatite na matriz polimérica de PLGA revela resultados interessantes para o uso de *scaffolds* produzidos por *electrospinning*, para a regeneração e reparação do osso humano. Como se pode verificar os estudos reportados focam-se tipicamente no comportamento mecânico ou no comportamento biológico do sistema PLGA/HA.

Com este trabalho pretende-se estudar a conjugação entre os estudos anteriormente referidos, de forma a compreender qual a melhor proporção de PLA e PGA utilizada, e qual a melhor percentagem de HA a adicionar ao PLGA para que se continue a ter bons resultados biológicos, não perdendo o seu bom desempenho mecânico. Para isso expecta-se obter *scaffolds* com as propriedades mecânicas 0,1-5GPa de módulo de Young e uma morfologia alinhada de diâmetros entre 50 a 500nm e com porosidade 50-90%.

2.3.4 Métodos de fabrico de *scaffolds*

Na última década, as investigações revelaram o desenvolvimento de variadas técnicas de fabrico de *scaffolds* para engenharia de tecidos. O objetivo destes *scaffolds* é biomimetizar a matriz extracelular do osso nativo permitindo assim a proliferação das células. Neste contexto, os *scaffolds* podem ser fabricados em tamanho micro ou nano, contudo a escala nano permite obter melhores resultados devido não só ao seu pequeno tamanho, mas também à elevada área de superfície, aumentando assim a área de adesão e proliferação das células [28]. Pela mesma razão, as propriedades mecânicas da escala nano são melhoradas comparativamente à escala micro, uma vez que a área da fronteira de grão comparativamente à área de grão é significativamente superior na escala nano.

Numa escala nanométrica, os *scaffolds* podem ser produzidos na forma de nanoporos ou nanofibras. Contudo as nanofibras são as que demonstram melhores resultados quanto à proliferação celular, pois a estrutura da matriz extracelular é constituída por nanofibras (50-500nm de diâmetro), como referido anteriormente. Deste modo, com o intuito de simular as fibras de colagénio estas devem possuir diâmetros entre o intervalo desejado (50-500nm)

As nanofibras podem ser produzidas por vários métodos como separação de fases, liofilização e *electrospinning*[34]. A técnica de separação de fases requer mudanças de temperatura, de forma a separar a solução polimérica homogénea num sistema de duas fases, em que uma é constituída por um polímero de baixa concentração e outra por um polímero de elevada concentração. Consequentemente o polímero de alta concentração solidifica resultando a matriz pretendida, enquanto a fase constituída pelo polímero de baixa concentração transforma-se em poros devido á remoção do solvente. Por fim o gel de nanofibras

é removido através de uma secagem com o sistema de liofilização [34]. Esta técnica tem como desvantagem a falta de controlo do diâmetro das fibras [35].

O processo de liofilização envolve três etapas: a solução é congelada a baixas temperaturas (-70°C até -80°C) de seguida a amostra é inserida numa câmara onde é realizada a secagem primária em que o material é removido por sublimação direta e por fim faz-se a secagem secundária em que o material é removido por dessorção [34, 36, 37]. Contudo esta técnica tem algumas desvantagens como a dificuldade em manipular os produtos obtidos e o tempo de fabrico das fibras.

A técnica de *electrospinning* é a que revela maior facilidade de produção de nanofibras. Esta técnica tem como benefício em relação às anteriormente descritas, o facto de oferecer a oportunidade de controlo da morfologia das fibras, através da sua configuração relativamente simples. Neste sentido, será esta a técnica utilizada no presente trabalho e será consequentemente explicada de forma detalhada de seguida.

2.3.4.1 *Electrospinning*

Electrospinning é a técnica que será utilizada para produzir as nanofibras (*scaffolds*), pois a facilidade e a versatilidade desta tecnologia para a produção das nanofibras à escala nanométrica, fazem com que esta técnica se destaque das outras técnicas anteriormente referidas. O interesse da produção de fibras a partir desta técnica, como matriz tridimensional para engenharia de tecidos, tem crescido nas últimas décadas. A produção das nanofibras através desta técnica permite obter uma excelente interconetividade e um controlo da porosidade por ajuste do tamanho das fibras [15]. Deste modo, estas proporcionam um interessante significado fisiológico, demonstrando muitas analogias com a estrutura do osso nativo. Revelando-se especialmente importante para engenharia de tecidos, pois a estrutura e a composição do *scaffold* é determinante para o bom desempenho desta engenharia [1].

O processo *electrospinning* envolve três sistemas: um dispositivo de infusão (bomba de injeção) composta por uma seringa e uma agulha metálica, uma fonte de alta tensão de corrente contínua (CC) ligada eletricamente a um fluido e um coletor, como demonstrado na Figura 2.4. Inicialmente é preparada uma solução composta por um solvente e matriz polimérica. Após a preparação da solução, esta é inserida na bomba de injeção, sobre o efeito de um campo elétrico forte. A fonte de alta tensão é ligada à agulha da bomba de injeção, por um eletrodo positivo, e ao coletor por um eletrodo negativo, gerando assim uma diferença de potencial entre a agulha da bomba de injeção e o coletor. Assim que se atinge o equilíbrio entre a tensão superficial e a força electrostática da superfície carregada, o campo elétrico aumenta dando origem a uma gota de perfil cónico (cone de Taylor), como demonstrado na Figura 2.4 [38]. Quando o campo elétrico aplicado é superior à tensão superficial da gota, a solução é ejetada, sob a forma de um

jato de fluido carregado eletricamente, até ao eletrodo negativo que se encontra no coletor [38]. Aquando da formação das fibras, dá-se também a evaporação do solvente, resultando uma deposição de nanofibras sobre o coletor [1, 39, 40].

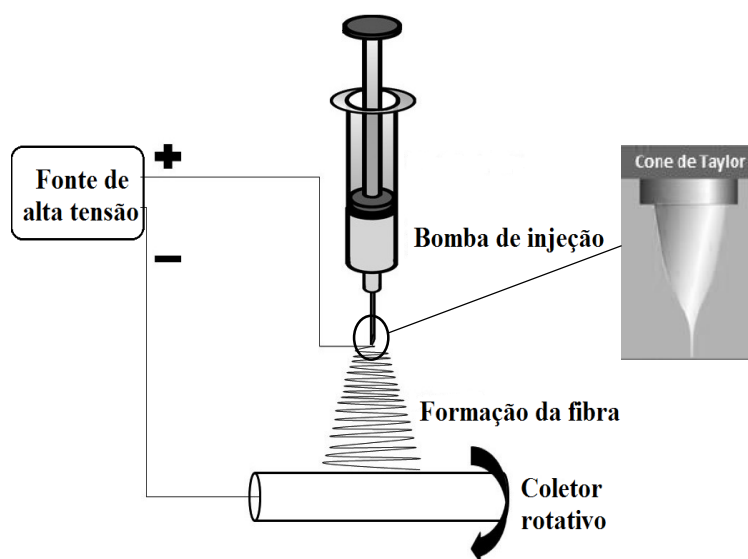


Figura 2.4- Representação da técnica de *electrospinning* [41, 12]

a) Parâmetros de processamento

Tendo em consideração a descrição teórica da técnica de *electrospinning*, é possível perceber que esta técnica tem associados parâmetros de processamento que permitem definir as propriedades das nanofibras. Segundo C. Mituppatham [43], estes parâmetros podem ser classificados em três categorias: propriedades da solução, parâmetros de processo e parâmetros ambientais.

As propriedades da solução incluem a viscosidade, condutividade elétrica, tensão superficial, massa molecular do polímero e o tipo de solvente utilizado [13, 15, 44]. Os efeitos das propriedades da solução são difíceis de controlar de forma individual, pois a variação de um parâmetro influencia o comportamento de outros parâmetros. A viscosidade da solução é um dos critérios mais determinantes na morfologia e no tamanho das nanofibras. Quando a viscosidade da solução é muito baixa, pode não ocorrer a formação de fibras mas de um jato de micro gotas, contudo se a viscosidade for muito elevada há possibilidade de haver obstrução na ponta da agulha devido à volatilização completa do solvente logo à saída da agulha. Associada à viscosidade está a massa molecular do polímero, de facto quanto maior for a massa molecular maior será a viscosidade da solução. Outro fator que afeta a viscosidade é a concentração da solução, quanto maior for, naturalmente maior será a viscosidade desta. I. Hayati [45] revelou que soluções altamente condutoras revelam comportamentos inconstantes na presença de fortes campos elétricos, causando

assim um aumento do diâmetro das fibras. Contudo com materiais semicondutores e isolantes obtêm-se fibras relativamente sólidas e uniformes embora com cargas livres na superfície do líquido. O tipo de solvente, devido ao tipo de interação criada entre as cadeias, pode afetar as propriedades da solução nomeadamente a viscosidade, a condutividade, e a tensão superficial.

Os parâmetros de processo como o campo elétrico, distância entre a extremidade da agulha e o coletor, taxa de fluxo da solução, o tipo de coletor e a velocidade de rotação do coletor, vão influenciar a morfologia das nanofibras [13, 44]. Quanto maior o campo elétrico aplicado, maior será o alongamento das fibras logo, menor será o diâmetro destas. A distância entre a extremidade da agulha e o coletor tem influência na intensidade do campo elétrico e no tempo de “voo” das fibras. Assim sendo, quanto maior for a distância menor é o diâmetro das fibras (dado um aumento do tempo de “voo”). O aumento da taxa de fluxo da solução favorece o aumento do diâmetro da fibra. Quanto maior a velocidade de rotação do coletor maior a orientação das fibras e menor o diâmetro destas.

Os parâmetros ambientais são constituídos por dois tipos os que têm origem nas condições locais da técnica ou o tipo de atmosfera em que o processo ocorre [15, 44]. Estes parâmetros centram-se na temperatura e na humidade. O aumento da temperatura provoca uma evaporação mais rápida do solvente. Este aumento também vai promover uma diminuição do diâmetro das nanofibras, isto deve-se à diminuição de viscosidade da solução resultante do aumento da temperatura. O aumento da humidade provoca a formação de nanofibras porosas ou a solidificação da solução ainda na fase do jato.

b) Tipos de coletores

A montagem básica do sistema *electrospinning* é caracterizada pela sua simplicidade e adaptabilidade a vários tipos de modelos. No entanto, a necessidade de melhorar o processamento dos materiais, de forma a aumentar a aplicabilidade das estruturas fibrosas, levou à necessidade de adaptação do sistema *electrospinning*. Deste modo, a utilização de diferentes coletores permite adaptar a montagem do sistema *electrospinning* às funcionalidades distintas das estruturas fibrosas. Tendo em consideração que o controlo da deposição das nanofibras é crítico, torna-se necessário variar o coletor, de forma a se conseguir controlar o trajeto do jato até ao coletor conseguindo a estrutura final de nanofibras pretendida. Os coletores mais utilizados para as diferentes montagens do sistema *electrospinning* são: coletor plano, coletor cilíndrico rotativo, coletor cilíndrico constituído por fios, coletor cilíndrico com fio enrolado sobre a superfície e coletor de disco. A Figura 2.5 representa os diferentes coletores para o sistema *electrospinning* referidos anteriormente.

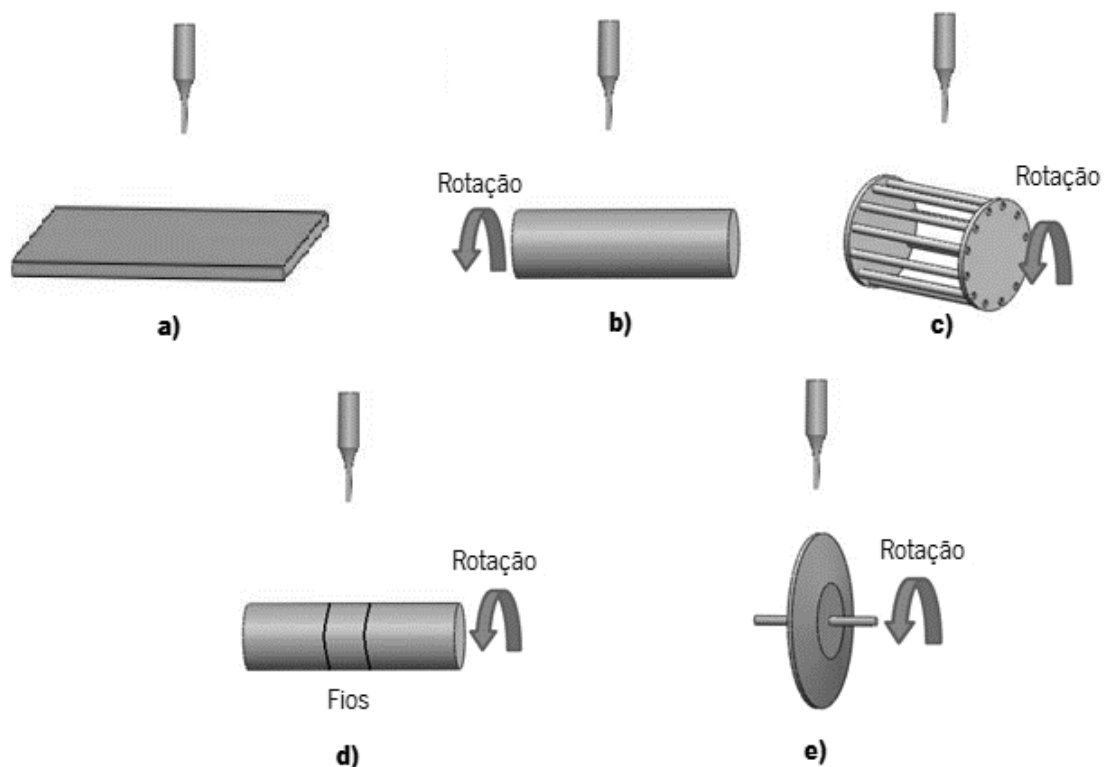


Figura 2.5- Representação dos diferentes coletores da técnica de *electrospinning*: a) coletor plano, b) coletor cilíndrico rotativo, c) coletor cilíndrico constituído por fios, d) coletor cilíndrico com fio enrolado sobre a superfície e e) coletor de disco [34]

A configuração com um coletor plano (Figura 2.5- a)) é caracterizada por uma montagem simples, revelando ser a configuração mais simplificada do sistema. Com esta montagem as fibras não têm qualquer tipo de orientação, resultando assim uma estrutura de nanofibras depositadas aleatoriamente sobre o coletor. O coletor cilíndrico rotativo (Figura 2.5- b)) é constituído por um cilindro com um diâmetro e comprimento variável, este também é caracterizado por uma montagem simples. Este tipo de montagem obedece a um grau de alinhamento das fibras, mas tem como limitação, o alinhamento só ser verificado para velocidades de rotação elevadas (2000 a 6000rpm) [13]. O coletor cilíndrico constituído por fios (Figura 2.5- c)) é caracterizado por um coletor cilíndrico composto por fios de cobre com um espaçamento predefinido. Este tipo de montagem permite o alinhamento das fibras, contudo também tem associadas desvantagens como o facto de não se conseguir fazer uma camada espessa de nanofibras como também não se consegue um alinhamento das fibras por toda a camada [46]. O coletor cilíndrico com fio enrolado na superfície (Figura 2.5- d)) obedece a uma simples montagem caracterizada por um cilindro rotativo com um fio condutor disposto sobre a superfície. Este sistema confere um elevado grau de alinhamento às fibras, a área do alinhamento das fibras é definida pela espessura do fio. Assim a área de fibras alinhadas está limitada à espessura do fio e não é definida pelo comprimento do coletor [46]. E por último, o coletor de disco (Figura 2.5- e)) possui uma extremidade afilada segundo um ângulo e uma largura. Esta configuração permite um

grau de alinhamento das fibras elevado, a sua limitação é o facto da área de alinhamento das fibras estar limitado à espessura do disco [46].

Como anteriormente referido, o alinhamento das fibras é um requisito requerido para os *scaffolds*, pois pode influenciar a ligação de células e o crescimento, proporcionando a estimulação da distribuição espacial das células. Assim sendo, para o presente trabalho, foram estudados dois tipos de coletores, o coletor cilíndrico rotativo e o coletor rotativo com um fio condutor na sua superfície. O estudo abrangeu estes dois coletores tendo por base o seu desempenho quanto ao alinhamento das fibras aliado ao tipo de coletores que o equipamento utilizado oferece.

2.4 Referências bibliográficas

- [1] N. M. Neves, *Electrospinning for Advanced Biomedical Applications and Therapies*. UK: Smithers Rapra, 2012.
- [2] S. Izwan, A. Razak, N. Fadzliana, A. Sharif, W. Aizan, and W. Abdul, "Biodegradable Polymers and their Bone Applications : A Review," *International journal of basic & Applied Sciences*, vol. 12, pp. 31-49, 2012.
- [3] D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, C. Xu, F. Lam, K. C. Tan, and T. C. Lim, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective," *Tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 1, pp. 245-260, 2007.
- [4] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone tissue engineering: state of the art and future trends," *Macromolecular bioscience*, vol. 4, pp. 743-765, 2004.
- [5] (1 de Novembro 2013). *Sistema Esquelético*. Available: <http://dc397.4shared.com/doc/6zMc9-zN/preview.html>
- [6] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone," *Medical engineering & physics*, vol. 20, pp. 92-102, 1998.
- [7] L. Lao, Y. Wang, Y. Zhu, Y. Zhang, and C. Gao, "Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering," *Journal of materials science. Materials in medicine*, vol. 22, pp. 1873-1884, 2011.
- [8] R. Langer, "Tissue engineering," *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 1, pp. 12-15, 2000.
- [9] A. Tamayol, M. Akbari, N. Annabi, A. Paul, A. Khademhosseini, and D. Juncker, "Fiber-based tissue engineering: Progress, challenges, and opportunities," *Biotechnol Adv*, vol. 31, pp. 669-687, 2013.
- [10] S. H. Barbanti, C. A. C. Zavaglia, and E. A. R. Duek, "Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos," *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 15, pp. 13-21, 2005.
- [11] D. T. Dvir. (1 de Novembro 2013). *Tissue Engineering*. Available: <http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/biotech/members/dvir/dvir.html>
- [12] Y. Ikada, "Challenges in tissue engineering," *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, vol. 3, pp. 589-601, 2006.
- [13] A. Martins, J. V. Araújo, R. L. Reis, and N. M. Neves, "Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications," *Nanomedicine*, vol. 2, pp. 929-942, 2007.
- [14] S. Sell, P. Wolfe, K. Garg, J. McCool, I. Rodriguez, and G. L. Bowlin, "The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues," *Polymers*, vol. 2, pp. 522-553, 2010.
- [15] M. R. Ladd, T. K. Hill, J. J. Yoo, and S. J. Lee, "Electrospun Nanofibers in Tissue Engineering," *Nanofibers – Production, Properties and Functional Applications*, pp. 347-372, 2008.

- [16] B. P. Chan and K. W. Leong, "Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations," *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, vol. 17 pp. 467-479, 2008.
- [17] C. Rodrigues. (4 de Março 2014). *Tecidos Conjuntivo, Ósseo e Cartilaginoso*. Available: <http://tecidosenfermagemfainor.blogspot.pt/2013/04/faculdade-independente-donordeste-fainor.html>
- [18] J. E. Davies, "In vitro modeling of the bone/implant interface," *The anatomical record*, vol. 245, pp. 426-445, 1996.
- [19] J. J. Klawitter and S. F. Hulbert, "Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 5, pp. 161-229, 1971.
- [20] N. B. S. Bhattaraia, H. Yic, P. Hwangc, D. Chad, H. Kimd, "Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 2595–2602, 2004.
- [21] F. O. B. C. Murphy, "Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds," *Cell Adhesion & Migration*, vol. 43, pp. 377-381, 2010.
- [22] L. Lu and A. G. Mikos, "The importance of new processing techniques in tissue engineering," *Mrs Bulletin*, vol. 21, pp. 28-32, 1996.
- [23] R. M. Pilliar, R. A. Kandel, M. D. Gryn timer, and Y. Hu, "Porous calcium polyphosphate as load-bearing bone substitutes: In vivo study," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 101, pp. 1-8, 2013.
- [24] R. Quarto, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S. M. Kutepov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon, and M. Marcacci, "Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells," *New England Journal of Medicine*, vol. 344, pp. 385-386, 2001.
- [25] H. Petite, V. Viateau, W. Bensaid, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, and G. Guillemain, "Tissue-engineered bone regeneration," *Nature biotechnology*, vol. 18, pp. 959-963, 2000.
- [26] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman, and A. P. Tomsia, "Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 31, pp. 1245-1256, 2011.
- [27] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Progress in Polymer Science*, vol. 32, pp. 762-798, 2007.
- [28] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, and J. M. Kenny, "Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, pp. 2126-2146, 2010.
- [29] G. Chen, T. Ushida, and T. Tateishi, "Scaffold Design for Tissue Engineering," *Macromolecular bioscience*, vol. 2, pp. 67-77, 2002.
- [30] A. C. F. de Melo Costa, M. G. de Lima, L. H. M. de Almeida Lima, V. V. Cordeiro, K. M. de Souto Viana, C. V. de Souza, and H. de Lucena Lira, "Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações," *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, vol. 4, pp. 29-38, 2009.
- [31] M. Bohner, "Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements," *Injury*, vol. 31, pp. 37-47, 2000.
- [32] K. Rezwan, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, and A. R. Boccaccini, "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3413-3431, 2006.
- [33] M. V. Jose, V. Thomas, K. T. Johnson, D. R. Dean, and E. Nyairo, "Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering," *Acta Biomater*, vol. 5, pp. 305-315, Jan 2009.
- [34] T. Lu, Y. Li, and T. Chen, "Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering," *International journal of nanomedicine*, vol. 8, pp. 337-350, 2013.
- [35] V. a. Katti, "Nanofibers and their applications in tissue engineering," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 1, pp. 15–30, 2006.

- [36] R. Thomson, A. Shung, M. Yaszemski, and A. G. Mikos, "Polymer scaffold processing," A. Press, Ed., Second edi ed, 2000, pp. 251-262.
- [37] D. Lee, C. Zhang, and H. Gao, "Facile Production of Polypyrrole Nanofibers Using a Freeze-Drying Method," *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 215, pp. 669-674, 2014.
- [38] P. Portela, "Montagem e Automatização de um Sistema de Electrospinning," Tese de mestrado em Engenharia Electrónica Industrial e Computadores, Escola de Engenharia, Universidade do Minho 2010.
- [39] R. Ramaseshan, S. Sundarajan, R. Jose, and S. Ramakrishna, "Nanostructured ceramics by electrospinning," *Journal of Applied Physics*, vol. 102, pp. 1-17, 2007.
- [40] I. S. Chronakis, "Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process—A review," *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 167, pp. 283-293, 2005.
- [41] J.-M. Bourget, M. Guillemette, T. Veres, F. o. A. Auger, and L. Germain, "Alignment of Cells and Extracellular Matrix Within Tissue-Engineered Substitutes," 2013.
- [42] UFRN. (13 de Fevereiro 2014). *Nanotecnologia aplicada à engenharia tecidual*. Available: <http://nanotec-ufrn.blogspot.pt/2012/11/nanotecnologia-e-medicina-regenerativa.html>
- [43] C. Mituppatham, M. Nithitanakul, and P. Supaphol, "Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter," *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 205, pp. 2327-2338, 2004.
- [44] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review," *Tissue engineering*, vol. 12, pp. 1197-1211, 2006.
- [45] I. Hayati, A. I. Bailey, and F. Tadros, "Investigations into the Mechanisms of Electrohydrodynamic Spraying of Liquids," *Colloid and Interface Science*, vol. 117, pp. 205-221, 1987.
- [46] W. E. Teo and S. Ramakrishna, "A review on electrospinning design and nanofibre assemblies," *Nanotechnology*, vol. 17, pp. R89-R106, Jul 28 2006.

Capítulo 3

Materiais e

Produção dos *scaffolds*

3.1 Materiais

Os materiais utilizados para a produção do compósito de nanofibras foram o compósito poli (láctido-co-glicólido) (PLGA) e a hidroxiapatite (HA). De forma a se perceber qual a proporção de monómeros de PLGA em que se consegue obter propriedades mecânicas semelhantes às do osso, foram utilizados PLGA constituídos por duas diferentes proporções de ácido láctico (PLA) e ácido glicólico (PGA). Assim, tal como indicado na Tabela 3.1 foram selecionados, de entre as proporções existentes na indústria, o PLGA 75/25 e o PLGA 85/15. A escolha destas duas proporções de polímero teve por base o tempo de degradação do polímero. Um tempo inferior a 2 meses é prematuro pois ainda não houve oportunidade para ocorrer a formação do novo tecido, contrariamente um período superior a 6 meses é elevado pois o novo tecido já está completamente formado [1, 2]. A formação do tecido ocorre entre 3 a 6 meses após implantação do *scaffold* [1, 2]. A hidroxiapatite utilizada, de código comercial 677418 da Sigma Aldrich, possui um tamanho de partícula inferior a 200nm, a sua pureza não é inferior a 97% e a área de superfície superior a 9,4 m²/g.

Tabela 3.1- Proporções do polímero poli (láctido-co-glicólido) [1]

PLGA	75/25	85/15
Código comercial (Sigma Aldrich)	P1941	739979
Massa molecular, M_w (g/mol)	66.000-107.000	190.000-240.000
Estrutura	Amorfa	Amorfa
Temperatura de transição vítrea, T_g (°C)	60	45
Tempo de degradação (meses)	2 - 4	6

Para a produção de nanofibras através da técnica de *electrospinning* é necessária a utilização de um solvente. A sua escolha é um fator importante, pois existe a possibilidade de após a produção das nanofibras, estas ainda conterem resíduos deste, o que poderá eventualmente comprometer a sua aplicação na área biomédica [4]. Por este motivo, foi utilizado o solvente 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP), com a fórmula química (CF₃)₂CHOH e de código comercial 293410500 da Acros Organics, uma vez que este é orgânico. O solvente orgânico também tem como vantagem facilitar a formação das fibras pela técnica de *electrospinning* [5]. O HFP foi também escolhido por ser um solvente polar e hidrofílico, reduzindo assim a aglomeração das partículas de hidroxiapatite ao mesmo tempo que proporciona uma melhor dispersão na matriz polimérica [6].

3.2 Produção dos *scaffolds*

3.2.1 Produção das soluções de PLGA

Como referido anteriormente as nanofibras do compósito PLGA e HA foram produzidas pela técnica de *electrospinning*. Primeiramente foram produzidas nanofibras de duas proporções diferentes dos monómeros de PLGA. Após a escolha da proporção de PLGA a utilizar foram adicionadas duas percentagens diferentes de HA ao PLGA de forma a estudar qual apresenta propriedades mais semelhantes às do osso.

Para a produção das nanofibras, em primeiro lugar foi necessário produzir as soluções a utilizar no sistema *electrospinning*. Tendo por base o estudo de Moncy V. Jose [7], utilizou-se uma concentração de 0,16 g/ml de PLGA 85/15 (soluto) e HFP (solvente). De forma a otimizar a morfologia das nanofibras, foi testada uma outra concentração variando a massa de soluto, de forma a alterar a viscosidade da solução. A concentração para cada solução, como as respetivas concentrações utilizadas estão apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Soluções e respetivas concentrações utilizadas para a produção nanofibras de PLGA 85/15

Solução	$V_{Solvente}$ (ml)	m_{Soluto} (g)	Concentração [g/ml]
1	13	2,08	0,16
2	13	1,04	0,08

Tendo por base as concentrações utilizadas para a solução de PLGA 85/15 e HFP, foram realizadas as soluções de PLGA 75/25, onde, com o mesmo objetivo (ajustar a viscosidade para a utilização da solução no *electrospinning* e se conseguir menores diâmetros de nanofibras), também foram estudadas diferentes concentrações (Tabela 3.3).

Tabela 3.3- Soluções e respetivas concentrações utilizadas para a produção nanofibras de PLGA 75/25

Solução	$V_{Solvente}$ (ml)	m_{Soluto} (g)	Concentração [g/ml]
3	13	1,30	0,08
4	13	1,95	0,15
5	13	1,69	0,13

Mais especificamente, a preparação das soluções consistiu na pesagem de cada material, tendo em conta a concentração estipulada inicialmente, com o auxílio da balança de precisão (*Meter toledo MS2045 New classic MF*), que se encontra no Laboratório de Ensaios, Desgaste e Materiais (LED&MAT) do Instituto Pedro Nunes em Coimbra. Após a pesagem efetuou-se a adição do polímero ao solvente, e de seguida a sua mistura foi realizada com o auxílio de um agitador magnético durante três horas, à temperatura ambiente. Após a agitação, as bolhas de ar contidas nas soluções foram removidas com o recurso a um equipamento ultrassons durante dez minutos. Este procedimento foi utilizado para as soluções de PLGA correspondentes às duas proporções de polímero utilizadas. Após a produção das soluções de PLGA foram produzidas as soluções de PLGA/HA. Contudo, sabendo à partida que as nanopartículas de HA teriam tendência para aglomerar devido às ligações covalentes ou interações electrostáticas entre as nanopartículas, antes de se iniciar a produção das soluções de PLGA e HA tornou-se imperativo um estudo da melhor forma e do tempo necessário para a desaglomeração das nanopartículas de HA.

3.2.2 Desaglomeração das nanopartículas de HA

A desaglomeração das nanopartículas de HA é uma etapa essencial na produção das soluções, pois se estas se encontrarem aglomeradas vão alterar as propriedades mecânicas das nanofibras. Neste sentido, no presente trabalho foi necessário recorrer a um sistema de desaglomeração das nanopartículas de HA na solução de HFP/PLGA. Com este fim, foram produzidas duas soluções de 3 ml de HFP e 1% e 5% de HA e após a sua produção, estas foram colocadas no banho de um ultrassons (*Bandelin Sonorex RK 106S* que se encontra na Unidade de Caracterização e Certificação de Materiais Granulares do Instituto Pedro Nunes em Coimbra). Para além do ultrassons, foi colocada no mesmo banho uma sonda (*Sonics e Materials inc vibra cell* que se encontra na Unidade de



Figura 3.1- Sistema de desaglomeração das nanopartículas de HA, destacando a sonda e a solução

Pedro Nunes em Coimbra), como apresentado na Figura 3.1. A eficiência da sonda de ultrassons é superior quando esta está em contacto direto com a solução, contudo por não ser necessário volumes tão elevados para a produção das amostras por *electrospinning* não foram realizadas soluções de grandes volumes. Após a colocação da sonda e das soluções no banho, os equipamentos foram ligados. Devido ao facto dos equipamentos aquecerem a água do banho, foi necessário colocar gelo no banho a cada 30 minutos de forma a evitar que a temperatura da água subisse acima da temperatura de ebulição do solvente ($> 60^{\circ}\text{C}$).

Com o objetivo de se estudar o tempo ótimo de desaglomeração das partículas de HA, foram retiradas e visualizadas em SEM amostras de 0h, 30m, 1h e 1h30m e de 1 em 1 hora até 6 horas de cada solução (num total de 8 tempos).

3.2.3 Produção das soluções de PLGA e HA

A proporção de polímero que revelou resultados mais promissores, quanto à morfologia e às suas propriedades mecânicas e, tendo em consideração os objetivos que se pretendem atingir, foi o PLGA 85/15 (analisado no capítulo 5). Neste sentido, este foi o polímero utilizado para a produção de *scaffolds* de PLGA/HA.

Como será discutido na secção 5.3, o estudo do tempo ótimo de imersão da solução no banho de ultrassons revelou que após duas horas de desaglomeração, os aglomerados são eliminados parcialmente, não revelando melhorias notórias com o aumento do tempo de desaglomeração. Após este estudo, procedeu-se à produção das soluções de PLGA e HA. Iniciando-se com a adição da percentagem pretendida de HA ao HFP, de seguida procedeu-se à desaglomeração das nanopartículas de HA com a imersão da solução durante duas horas, e por fim a adição do polímero PLGA 85/15 à solução HFP/HA. Após a adição de cada constituinte da solução, esta foi agitada com o auxílio de um agitador magnético durante três horas à temperatura ambiente e de forma a desaglomerar os possíveis aglomerados ainda existentes, a solução foi colocada no ultrassons, durante duas horas.

A concentração inicial utilizada para a produção das soluções teve por base a concentração satisfatória (0,08g/ml) para a solução de PLGA 85/15. Contudo verificou-se que a adição de HA à solução proporcionava uma alteração de viscosidade (menor viscosidade), assim de forma a otimizar a solução PLGA 85/15 + HFP/HA, foi produzida uma de maior concentração de PLGA. Para a solução de PLGA + 5% de HA a concentração foi aumentada (de 0,12 para 0,14g/ml), uma vez que a percentagem de HA adicionada é superior. As soluções e as respetivas concentrações utilizadas para a produção das nanofibras de PLGA 85/15 com adição de diferentes percentagens de HA estão apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Soluções e respetivas concentrações utilizadas para a produção nanofibras de PLGA 85/15 com adição de diferentes percentagens de HA

Solução	$V_{Solvente}$ (ml)	m_{Soluta} (g)	Concentração [g/ml]	% HA
6	13	1,04	0,08	1
7	13	1,56	0,12	
8	13	1,82	0,14	5

3.2.4 *Electrospinning*

Após a produção das soluções procedeu-se à preparação do sistema *electrospinning*. Neste trabalho o sistema *electrospinning* utilizado foi o *NaBond NEU-01* que se encontra na sala limpa do Instituto Pedro Nunes em Coimbra (Figura 3.2). Como abordado anteriormente, o alinhamento das fibras é um dos requisitos dos *scaffolds*, neste sentido no presente trabalho foram utilizados dois coletores o coletor cilíndrico rotativo e o coletor cilíndrico rotativo com um fio de cobre (fio condutor).

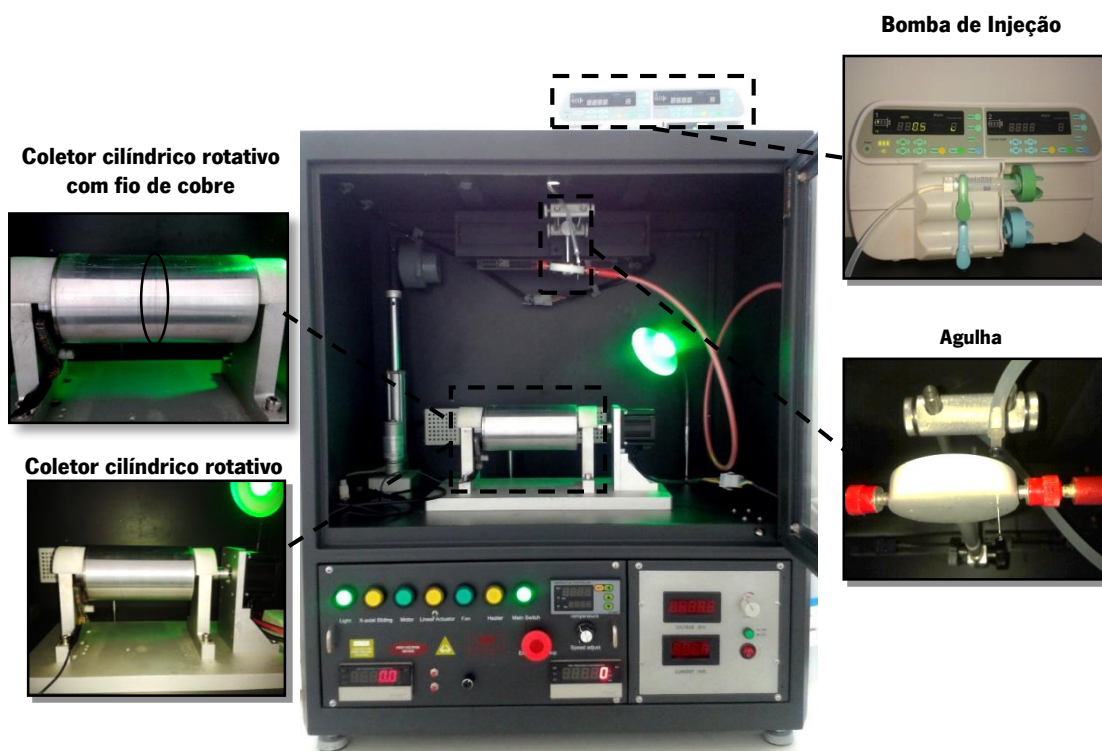


Figura 3.2- Sistema *electrospinning* NaBond NEU-01

A preparação do sistema *electrospinning* foi elaborada em várias fases. Numa primeira fase colocou-se a seringa com a solução, na bomba de injeção e conectou-se a seringa à agulha. De seguida, foi colocado papel de alumínio no coletor rotativo ou coletor rotativo com um fio condutor, sendo este o substrato de recolha das nanofibras após a sua produção. O eléctrodo positivo foi ligado à agulha e o eléctrodo negativo ao coletor, de forma a gerar uma diferença de potencial. O sistema de injeção, responsável pelo controlo da taxa de fluxo de solução e o sistema de controlo do equipamento, responsável por controlar todos os parâmetros de processo do sistema, foram ligados. Por fim, foi ligada a ventilação da câmara e a luz (de forma a ter uma maior visibilidade da produção das fibras), fechou-se a câmara do sistema e estabeleceu-se os parâmetros a utilizar para a deposição. A produção das amostras teve uma duração média de 15 minutos.

De forma a alcançar os requisitos morfológicos pretendidos para as nanofibras (*scaffolds*) é primordial efetuar testes de otimização de parâmetros do sistema, com intuito de perceber de que forma os parâmetros de processo do sistema *electrospinning* influenciam o diâmetro e o alinhamento das fibras. Para a elaboração destes testes, foi utilizado o acetato de Polivinila (PVA)², pois este estava disponível em quantidades mais elevadas. A produção da solução consistiu na adição do polímero a água destilada com uma concentração de 0,1g/ml. A solução foi agitada com o auxílio de um agitador magnético a uma temperatura de 90°C durante 4 horas.

3.2.4.1 Otimização de parâmetros de processo

A otimização de parâmetros de processo pretende estudar a sua influência na morfologia das fibras, mais precisamente no diâmetro destas e no seu alinhamento, como referido anteriormente. Neste sentido, foi estudado o campo elétrico, a distância entre o coletor e a extremidade da agulha, a taxa de fluxo e a velocidade de rotação do coletor. Para além destes parâmetros também foram estudados dois tipos de coletores, coletor rotativo e o coletor rotativo com um fio condutor (fio de cobre). As amostras foram produzidas com a duração de 15 minutos a uma temperatura de 23°C e humidade de 60%.

a) Campo elétrico

O diâmetro das fibras é uma propriedade morfológica a ter em consideração para os *scaffolds*. Como referido anteriormente, o diâmetro das fibras deverá ser entre 50 a 500nm, para que os *scaffolds* forneçam um ambiente apropriado para a adesão, proliferação e diferenciação celular.

O campo elétrico tem influência no diâmetro das fibras, sendo que o seu aumento favorece a diminuição do diâmetro das fibras, e desta forma estas serão mais facilmente estiradas. No corrente trabalho foram estudados campos elétricos desde 18 até 26kV, sendo os limites mínimo e máximo para se conseguir produzir fibras sem alterar os outros parâmetros.

b) Distância entre o coletor e a agulha

A distância entre o coletor e a extremidade da agulha tem influência no campo elétrico e no tempo de voo das fibras, assim quanto maior for a distância menor é o diâmetro destas. Uma variação da distância entre o coletor e a extremidade da agulha implica um ajuste no campo elétrico, para fibras com diâmetro

² Acetato de Polivinila (PVA) de massa molecular de 85,000-124,000 e de pureza 99%.

constante. No presente trabalho, foram testadas distâncias desde 10 até 20cm, sendo o mínimo e o máximo permitidos pelo equipamento.

d) Taxa de fluxo da solução

A taxa de fluxo da solução, assim como o campo elétrico e a distância entre o coletor e a extremidade da agulha, está associada linearmente ao diâmetro das fibras. Quanto maior for a taxa de fluxo maior será o diâmetro das fibras. Para este trabalho foram testadas taxas de fluxo desde 0,5 até 2,5ml/h, sendo os limites mínimo e máximo para se conseguir produzir fibras sem alterar os outros parâmetros.

e) Velocidade de rotação do coletor

A matriz extracelular do osso possui fibras de colagénio alinhadas, este facto leva a um particular interesse no alinhamento das fibras para *scaffolds*. O alinhamento das fibras pode influenciar a adesão de células e o seu crescimento e também proporcionar a estimulação para a distribuição espacial das células e orientação [2]. O parâmetro que está diretamente associado ao alinhamento das fibras é a velocidade de rotação do coletor. Deste modo, para o presente trabalho, foram estudadas diferentes velocidades de rotação do coletor desde aproximadamente 900 até 4000rpm, sendo o limite mínimo para se conseguir produzir fibras sem alterar os outros parâmetros e o limite máximo do atingido pelo equipamento. Para além da velocidade de rotação do coletor, o tipo de coletor a utilizar, segundo W. Teo [8] também pode influenciar o alinhamento das fibras. Posto isto, foram estudados dois tipos de coletores, o coletor rotativo e o coletor rotativo com um fio de cobre (condutor).

Os parâmetros de processo para cada amostra de PVA produzida por *electrospinning* estão apresentados na Tabela 3.5. A amostra PVA3 foi a utilizada como amostra padrão, ou seja, os seus parâmetros serviram como comparação para as outras amostras. Os parâmetros representados a vermelho correspondem aos parâmetros que foram variados de forma a estudar a morfologia das fibras com a alteração do valor do parâmetro em estudo. A temperatura e a humidade na câmara foram 23°C e 60%, respetivamente.

Tabela 3.5- Parâmetros de processo de *electrospinning* utilizados para cada amostra de PVA para a otimização de parâmetros de processo

Amostra	Campo elétrico (kV)	Distância (coletor e agulha) (cm)	Taxa de fluxo (ml/h)	Velocidade de rotação do coletor (rpm)
PVA1	18	10	0,5	4000
PVA2	20	10	0,5	4000
PVA3	23	10	0,5	4000
PVA4	26	10	0,5	4000
PVA5	23	13	0,5	4000
PVA6	23	16	0,5	4000
PVA7	23	20	0,5	4000
PVA8	23	10	1,5	4000
PVA9	23	10	2,5	4000
PVA10	23	10	3,5	4000
PVA11	23	10	0,5	900
PVA12	23	10	0,5	1900
PVA13	23	10	0,5	3400

3.2.4.2 Produção dos *scaffolds* de PLGA

Após a produção das soluções e a otimização dos processos do *electrospinning* para a produção das nanofibras, procedeu-se à produção dos *scaffolds* de PLGA referentes às duas diferentes proporções mencionadas anteriormente, PLGA 85/15 e 75/25.

Iniciou-se a produção dos *scaffolds* de PLGA com a proporção de 85/15. Inicialmente utilizou-se os parâmetros de processamento do estudo de Moncy V. Jose [7], apresentados na Tabela 3.6 para a amostra 1, contudo não foi possível aplicar uma velocidade de rotação do coletor igual à referida no estudo (6000rpm) pois o equipamento não permite rotações tão elevadas. Após a observação da amostra por microscopia eletrónica de varrimento, foram realizadas outras amostras variando outros parâmetros de processo, com o objetivo de otimizar a morfologia dos *scaffolds*.

Os parâmetros de processo utilizados para cada amostra de PLGA 85/15 estão apresentados na Tabela 3.6. As amostras foram produzidas com a duração de 15 minutos a uma temperatura de 23°C e humidade de 60%.

Tabela 3.6- Parâmetros do processo *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de PLGA 85/15

Amostra	Solução	Taxa de fluxo (ml/h)	Velocidade de rotação do coletor (rpm)	Campo elétrico (kV)	Distância entre o coletor e a agulha (cm)
1	1	3	3500	13	20
2		3	3500	11	20
3	2	0,5	3900	13	20
4		0,5	3900	18	20

Após a produção das amostras de PLGA 85/15 foram produzidas as amostras de PLGA 75/25 com os parâmetros descritos na tabela seguinte (Tabela 3.7). Tal como as amostras de PLGA 85/15 foram produzidas com a duração de 15 minutos à mesma temperatura e humidade que as amostras anteriores.

Tabela 3.7- Parâmetros do processo *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de PLGA 75/25

Amostra	Solução	Taxa de fluxo (ml/h)	Velocidade de rotação do coletor (rpm)	Campo elétrico (kV)	Distância entre o coletor e a agulha (cm)
5	3	0,5	3900	14	20
6		0,5	3900	19	20
7	4	0,5	3900	14	20
8		0,5	3900	18	20
9	5	0,5	3800	14	20
10		0,5	3800	18	20

3.2.4.3 Produção dos *scaffolds* de PLGA e HA

Antes de se produzir os *scaffolds* de PLGA e HA realizou-se um estudo dos parâmetros da solução, para um maior controlo do processo e da morfologia das fibras. Foram estudados a massa molecular do polímero, o tipo de solvente utilizado e a tensão superficial. A massa molecular do polímero PLGA 85/15 é de 190.000-240.000 e o solvente utilizado é orgânico, polar e hidrofílico com o nome de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP). A tensão superficial para cada solução (Tabela 3.8) foi medida pelo goniómetro *Dataphysis OCA 15 plus* situado no Laboratório de Microscopia do Departamento de Polímeros da Universidade do Minho em Guimarães. A temperatura e a humidade na câmara eram de 23°C e 60%, respetivamente.

Tabela 3.8- Medidas de tensão superficial para a solução de PLGA 85/15 e para cada solução de PLGA 85/15 + HA

	PLGA 85/15	PLGA + 1% HA	PLGA+ 5% HA
Tensão superficial (mN/m)	186,15 ± 15,95	8,21 ± 0,46	7,79 ± 0,21

A produção dos *scaffolds* de PLGA 85/15 e HA foi realizada tendo como base os parâmetros utilizados para a produção da amostra 4 de PLGA 85/15, uma vez que foi esta a que revelou melhores resultados mecânicos e estruturais, como se poderá ver discutido nas secções 5.2.1 e 5.2.2. Com o objetivo de se otimizar a morfologia das fibras foram variados alguns dos parâmetros do processo de *electrospinning* na produção dos compósitos de PLGA com HA apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9- Parâmetros do processo de *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de PLGA 85/15 com adição de diferentes percentagens de HA

Amostra	% HA	Solução	Taxa de fluxo (ml/h)	Velocidade de rotação do coletor (rpm)	Campo elétrico (kV)	Distância entre o coletor e a agulha (cm)
11	1	6	0,5	4000	18	20
12		7	0,5	4000	18	20
13		7	0,5	4000	24	20
14	5	8	0,5	4000	24	20
15		8	1,5	4000	24	20

3.3 Referências bibliográficas

- [1] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2529-43, 2000.
- [2] D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, C. Xu, F. Lam, K. C. Tan, and T. C. Lim, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective," *Tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 1, pp. 245-260, 2007.
- [3] J. A. Cardillo and S. Cunha, "Implantes biodegradáveis destinados à administração," pp. 891-896, 2003.
- [4] A. Martins, J. V. Araújo, R. L. Reis, and N. M. Neves, "Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications," *Nanomedicine*, vol. 2, pp. 929-942, 2007.
- [5] U. F. N. Summer, S. Technologies, P. Tsing, P. Advisor, and D. M. Elliott "Electrospinning natural polymers for tissue engineering applications," pp. 1-15.
- [6] S. Izwan, A. Razak, N. Fadzliana, A. Sharif, W. Aizan, and W. Abdul, "Biodegradable Polymers and their Bone Applications : A Review," *International journal of basic & Applied Sciences*, vol. 12, pp. 31-49, 2012.
- [7] M. V. Jose, V. Thomas, K. T. Johnson, D. R. Dean, and E. Nyairo, "Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering," *Acta Biomater*, vol. 5, pp. 305-315, Jan 2009.
- [8] W. E. Teo and S. Ramakrishna, "A review on electrospinning design and nanofibre assemblies," *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 89-106, 2006.

Capítulo 4

Caraterização dos *scaffolds*

4.1. Técnicas de caraterização

As técnicas de caraterização utilizadas neste trabalho têm como intuito avaliar as propriedades morfológicas, mecânicas, estruturais, térmicas e superficiais dos *scaffolds* resultantes do seu processamento através do *electrospinning*. Tal como indicado no esquema da Figura 4.1.

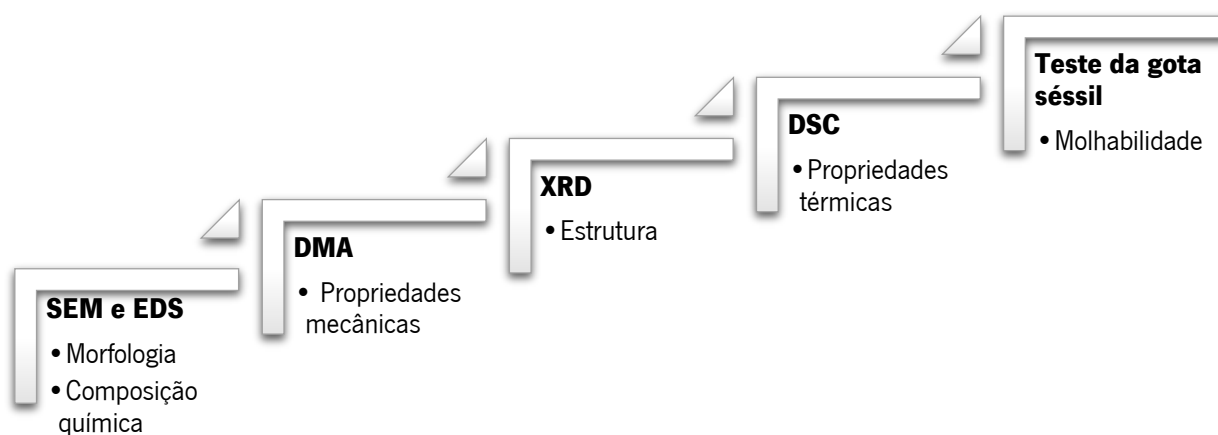


Figura 4.1- Esquema representativo das técnicas utilizadas para a caraterização dos *scaffolds*

4.1.1 Microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de energia dispersiva de raios X

A microscopia eletrónica de varrimento, do inglês *Scanning Electron Microscopy* (SEM), consiste num microscópio eletrónico que permite a obtenção de imagens semelhantes ao microscópio ótico mas com uma gama de ampliação superior (10x até 18000x) com uma profundidade de campo de 30µm. Acoplado a esta técnica encontra-se a espectroscopia de dispersão de energias de raios X, do inglês *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* (EDS), que permite avaliar de forma qualitativa e quantitativa a composição química da superfície do material.

O princípio básico de funcionamento do SEM consiste na incidência de um feixe de eletrões, através de um canhão de eletrões, numa área localizada da superfície da amostra. A interação do feixe de eletrões com a superfície da amostra vai originar a emissão de diferentes tipos de eletrões da superfície da amostra, como os eletrões secundários, eletrões retro difundidos e eletrões de Auger. As emissões mais relevantes para a formação da imagem pretendida da amostra são eletrões secundários e os eletrões retro difundidos [1]. Os eletrões secundários, de baixa energia (50eV) são caracterizados pelos eletrões da amostra que sofrem excitação, escapando-se da superfície, possibilitam a formulação da imagem [1]. Os eletrões retro difundidos, de maior energia de ligação, permitem a obtenção de informação da rugosidade da amostra, tendo por base o seu efeito de sombra. Sabendo que estes provêm de camadas profundas da amostra, a

resolução das imagens está dependente do feixe incidente e do número atómico médio local do material [1]. O EDS utiliza o espectro de Raio-X emitido por uma superfície sólida bombardeado por um feixe de eletrões focalizados, de forma a se obter a composição química. Esta técnica deteta todos os elementos com um número atómico entre 4 e 92 [1].

Este equipamento devido às suas potencialidades é um dos equipamentos mais poderosos da comunidade científica. Uma das maiores potencialidades deste equipamento é a obtenção de mapas de composição dos elementos à superfície da amostra. A análise dos diferentes sinais permite caracterizar uma amostra a vários níveis como a sua topografia, morfologia e composição química elementar.

A microscopia eletrónica de varrimento exige que as amostras obedeçam a alguns requisitos como: possuir boa condutividade elétrica superficial para que permitam a passagem de eletrões de forma a conceber imagem, caso não se verifique é necessário revestir a amostra com um filme fino de Au ou C, obtendo assim a condutividade necessária; estabilidade em alto vácuo, pois a técnica de SEM utiliza feixe de eletrões; estabilidade física e química, em condições de interação com o feixe eletromagnético.

Os equipamentos utilizados para a caracterização de SEM/EDS foram o *JEOL JSM-5310* que se encontra no Laboratório de Ensaio, Desgaste e Materiais (LED&MAT) do Instituto Pedro Nunes em Coimbra e o *NanoSEM – FEI Nova 200 (SEM)*; *EDAX - Pegasus X4M (EDS)* que se encontra no Laboratório de Serviços de Caracterização de Materiais (SEMAT) da Universidade do Minho em Guimarães. Como referido anteriormente para a visualização de uma amostra em SEM é necessário que as amostras sejam condutoras, como as nanofibras do presente trabalho não são condutoras foi necessário revestir as amostras. Foi realizado um revestimento de Au com o recurso ao equipamento *Edwards E2M1.5* que se encontra na oficina, do Instituto Pedro Nunes em Coimbra. Para a deposição do revestimento de Au foi utilizada uma voltagem de 10kV e foi realizado durante 30 segundos.

4.1.2 Análise mecânica dinâmica

A análise mecânica dinâmica, do inglês *Dynamic Mechanical Analysis* (DMA) ou *Dynamic Mechanical Thermal Analysis* (DTMA), é uma técnica de alta precisão fortemente utilizada para estudar o comportamento viscoelástico dos materiais poliméricos.

O seu princípio básico consiste na aplicação de uma tensão ou deformação mecânica oscilatória sobre uma amostra de geometria conhecida, e na medição da resposta à força transmitida. A força aplicada é chamada de tensão (σ) e será traduzida numa deformação (Y) no material [2]. A uma temperatura fixa, determina-se a curva tensão/deformação do material, e o seu declive dá informação acerca da rigidez do material e do seu módulo de armazenamento. O módulo de armazenamento é a energia mecânica que o material é

capaz de armazenar, sob a forma de energia potencial ou elástica, quando sujeito a determinadas condições experimentais de tensão [3]. Este processo é realizado com recurso a um analisador mecânico dinâmico, que aplica uma excitação dinâmica controlada por uma frequência e amplitude a uma amostra, dentro de condições definidas pelo operador. Esta técnica tem como vantagem a obtenção do módulo de armazenamento a cada onda sinusoidal que é aplicada, permitindo saber o respetivo valor numa gama de frequência e temperatura reduzida [2]. Para além do módulo de armazenamento (E'), esta técnica dá informação do módulo de perda (E''). O módulo de Young (E^*) possui um valor muito semelhante ao do módulo de armazenamento, pois a viscosidade dos materiais em estudo não é muito elevada, contudo o seu valor exato pode ser expresso em notação de números complexos pelas suas componentes, como indicado na Equação 4.1:

$$E^* = E' + iE'' \quad \text{Equação 4.1}$$

Para a análise de uma amostra em DMA, é necessário que esta cumpra alguns requisitos. O equipamento tem de estar devidamente calibrado, a calibração tem que ser realizada tendo em conta a força e a temperatura aplicada durante o ensaio [4]. A geometria da amostra também é um parâmetro a ter em consideração, é necessário que esta contenha uma espessura uniforme e lados paralelos.

Como referido anteriormente, o valor do módulo de Young é semelhante ao valor do módulo de armazenamento medido pelo equipamento. Neste sentido, o módulo de Young referido no presente trabalho equivale ao módulo de armazenamento testado pelo equipamento. No presente trabalho, o comportamento viscoelástico das nanofibras foi testado através do equipamento *DMA Triton*, que se encontra no Laboratório de Ciência de Polímeros, da Universidade do Minho em Guimarães. O varrimento de frequência utilizado foi de 0,1 a 100Hz com uma amplitude 15 μ m e uma força de 0,01N em condições de temperatura e humidade ambientais.

4.1.3 Difração de raios X

A difração de raios X, do inglês *X-ray Diffraction* (XRD), é uma técnica não destrutiva muito poderosa para caracterização cristalográfica de sólidos. A sua utilização permite determinar a(s) fase(s) cristalina(s) presente(s) e as suas propriedades estruturais (estado de tensão, tamanho de grão, composição da fase, orientação preferencial e defeitos na estrutura).

A difração de raios X é baseada numa interferência construtiva de raios X monocromáticos e uma amostra cristalina. A radiação raios X constituída por ondas eletromagnéticas é gerada por um tubo de raios catódicos, de seguida é filtrada, de forma a ser produzida a radiação monocromática, e por fim é incidida na amostra. Uma fração da radiação incidente é refletida pelo primeiro plano de átomos e a outra fração penetra na estrutura da amostra, produzindo assim uma interferência construtiva [1]. Esta interferência construtiva respeita a lei de Bragg (Equação 4.2), ou seja, a diferença de percurso entre os raios difratados ($2d\sin\theta$), sendo o d a distância interplanar para um conjunto de planos hkl (índices de Miller) e θ o ângulo de incidência dos raios X, é igual a um múltiplo inteiro (n) do comprimento de onda (λ) da radiação eletromagnética incidente [1].

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Equação 4.2

A distribuição dos átomos no espaço é o que dita a estrutura cristalina, subsequentemente os vários planos numa estrutura cristalina podem possuir diferentes densidades de átomos e/ou eletrões, deste modo as intensidades difratadas diferem entre os diversos planos cristalinos dando indicação acerca da orientação preferencial da amostra analisada.

A lei de Bragg pode ser simplificada através da Figura 4.2. As linhas horizontais representam os planos cristalinos da amostra, e as setas representam os raios X incidentes no cristal assim como os raios refletidos.

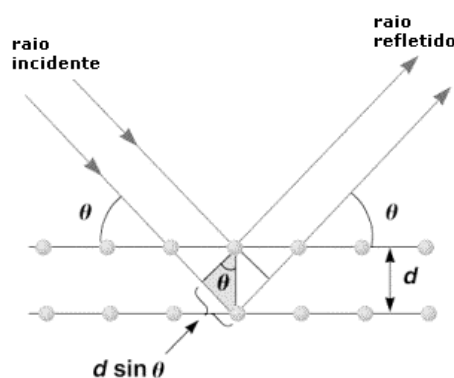


Figura 4.2- Representação do fenómeno da difração de raios X [5]

O difratograma de raios X é composto por uma sequência de picos caracterizados pelas suas posições, intensidades e larguras, correspondendo a uma orientação específica. A ocorrência de tensões de compressão uniforme, na direção paralela à superfície analisada provoca uma diminuição da distância interplanar da estrutura do material, isto origina uma contração em toda a célula unitária o que se traduz num deslocamento dos picos de difração do espectro [6]. A largura dos picos de difração pode variar consoante o tamanho de grão do cristal e também das tensões uniformes e não uniformes. Uma diminuição do tamanho de grão do cristal vai proporcionar um aumento da largura dos picos, assim como um aumento do número de átomos vai originar um aumento do volume do cristal. De igual forma, as tensões não uniformes num cristal proporcionam um aumento da largura dos picos do espectro, pois estas originam deformações não homogêneas alterando o volume do material [6].

Para esta análise foi utilizado o difratómetro *Bruker D8 Discover*, que se encontra no Laboratório de Serviços de Caracterização de Materiais (SEMAT) da Universidade do Minho em Guimarães. A radiação utilizada foi de $\text{CuK}\alpha 1$ com um comprimento de onda de $1,5406\text{\AA}$ e um substrato de silício. A gama de ângulos 2θ analisados foi de 10 a 60° e com uma velocidade de varrimento de $2^\circ/\text{min}$.

4.1.4 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento, do inglês *Differential Scanning Calorimetry* (DSC), é um tipo de análise térmica que estuda a capacidade calorífica de um material com a variação da temperatura. Uma amostra de massa conhecida é aquecida ou arrefecida e a variação de capacidade calorífica assim como o fluxo de calor são estudados. Também se obtém informação sobre as transições térmicas do material, como a temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e mudanças de fase. Devido à flexibilidade da técnica, esta é amplamente usada em diversas aplicações.

Esta técnica consiste na medição dos fluxos caloríficos de uma amostra e de um composto de referência quando sujeitos a uma variação de temperatura [7]. Posto isto, tanto a amostra como a referência são colocadas em cadinhos de alumínio, ou em caso de temperaturas superiores em cadinhos cerâmicos, de forma a serem inseridos em dois fornos independentes acoplados a dois sensores de temperatura. Tanto a amostra a analisar como a de referência são aquecidas ou arrefecidas num intervalo de temperatura e velocidade iguais definidas pelo utilizador. Antes de se iniciarem os ensaios de DSC com varrimento de temperatura, é necessário fazer uma linha de base no intervalo de temperaturas que se pretende trabalhar, com a finalidade de se anular eventuais diferenças inerentes aos fornos [7].

A maior vantagem desta técnica é a facilidade e a velocidade de uso para se estudar as transições térmicas que ocorrem nos materiais. Contudo, para se fazer DSC é necessário calibrar o equipamento de forma a

ter os padrões adequados. Para isso, a linha de base tem que possuir uma separação do pico da amostra de qualquer ruído, de forma a ser reproduzível [8].

A análise de calorimetria diferencial de varrimento foi realizada com o *DSC 200 F3 Maia Netzsch* que se encontra no Laboratório de Ciência de Polímeros, da Universidade do Minho em Guimarães. As amostras foram colocadas em cápsulas convencionais de alumínio e o patamar de temperatura utilizado foi de 0 a 70°C e com uma taxa de aquecimento de 3°C min⁻¹. Foram realizados três ensaios para cada amostra.

4.1.5 Teste da gota séssil

O teste da gota séssil permite estudar o ângulo de contacto entre um líquido e uma superfície sólida, sendo este o resultado das forças intermoleculares criadas na interface das duas faces. Este ângulo permite avaliar a interação entre a superfície sólida e o líquido. O teste consiste na injeção de um líquido através de uma seringa de forma a dispendir uma gota na superfície do sólido e como resultado origina um ângulo de contacto entre o sólido e o líquido. O ângulo é capturado através de uma câmara de vídeo e com o auxílio do *software* é analisada a gota de forma a avaliar o ângulo formado entre a gota e a superfície do sólido.

A gota ao contactar a superfície sólida vai originar uma interface tripla entre o sólido, o líquido e o vapor. O seu estado de equilíbrio depende das forças associadas às três tensões interfaciais. O equilíbrio das forças entre a interface tripla é dada pela equação de Young's (Equação 4.3).

$$\gamma_{lv} \cos\theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad \text{Equação 4.3}$$

Onde θ é o ângulo de contacto, γ_{lv} , γ_{sv} e γ_{sl} são as tensões de superfície das três interfaces criadas pelo sólido, líquido-vapor, sólido-vapor e sólido-líquido, respetivamente.

O ângulo de contacto é dado pela tangente no ponto onde a interface líquido-vapor vai de encontro entre a interface sólido-vapor e a superfície sólida, como demonstrado na Figura 4.3.



Figura 4.3- Esquema representativo do ângulo de contacto formado entre um líquido e uma superfície sólida [9]

A superfície sólida pode ser caracterizada de duas formas distintas, através do seu ângulo de contacto: superfícies hidrófilas $\theta < 90^\circ$ e superfícies hidrófobas $\theta \geq 90^\circ$ [10]. Se o ângulo de contacto for superior a zero $\theta > 0^\circ$, o líquido não se espalha completamente na superfície, oferecendo uma maior resistência ao espalhamento. Quando $\theta < 90^\circ$ o líquido molha parcialmente a superfície do sólido e a relação das tensões é sempre $\gamma_{sv} > \gamma_{sl} > \gamma_{lv}$. Pelo contrário, quando $\theta > 90^\circ$ o líquido não molha o sólido e apresenta uma relação de energias livres de $\gamma_{sv} < \gamma_{sl} < \gamma_{lv}$, como demonstrado na Figura 4.4. No caso de $\theta = 0^\circ$, o líquido molha na totalidade a superfície. Contudo, a interpretação dos valores do ângulo de contacto ainda não é consensual entre a comunidade científica.

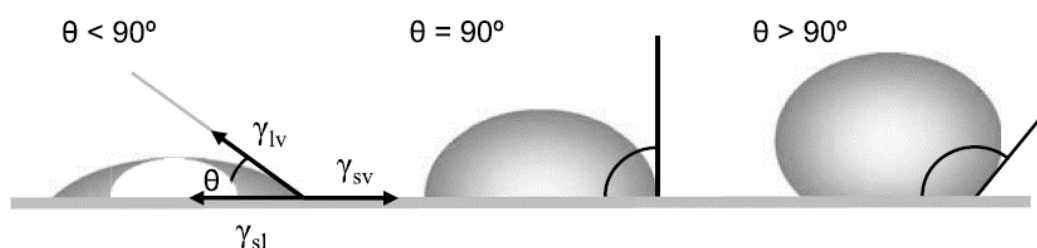


Figura 4.4- Esquema representativo da relação entre o ângulo de contacto e a molhabilidade [10]

No presente trabalho o ângulo de contacto foi medido através de um goniómetro *Dataphysis OCA 15 plus* que se encontra no Laboratório de Microscopia situado da Universidade do Minho em Guimarães. Todas as medições foram efetuadas com 3µl de água destilada, à temperatura ambiente e tendo em consideração o método La Place em modo estático. As amostras foram colocadas no equipamento com o papel de alumínio por baixo, tal como foram produzidas na técnica de *electrospinning* de forma a não alterar a rugosidade da superfície em estudo. O mesmo procedimento foi repetido 10 vezes para cada amostra.

4.2 Teste *in vitro* de biodegradação

Os testes *in vitro* de biodegradação foram realizados com intuito de avaliar/prever as alterações físicas dos *scaffolds*, em condições fisiológicas com o passar do tempo. Para a realização destes testes foi utilizada a solução tampão fosfato-salino (PBS do inglês *phosphate buffered saline*), sendo a solução uma simulação do fluido corporal humano. A solução foi preparada tendo por base o protocolo proposto por Joella Grossoehme [11] e sua composição está no Anexo I.

Em primeiro lugar, e para a realização destes testes foram cortadas quatro amostras de 1,5x1cm e quatro amostras de 1,5x1,5cm das amostras do tapete dos *scaffolds* correspondentes à amostra 4 de PLGA 85/15 e à amostra 13 de PLGA e 1% de HA. Foram cortadas duas amostras de dimensões diferentes como forma de confirmar os resultados e despistar influências esporádicas das condições do teste. A massa inicial (m_i) das amostras foi pesada na balança de precisão *Perkin Elmer AD 4 autobalance* que se encontra no Laboratório de Ciência de Polímeros, no Departamento de Polímeros da Universidade do Minho em Guimarães. Para confirmar que a retração observada surge puramente devido aos efeitos térmicos e não de efeitos de plastificação de água na matriz, os *scaffolds* foram embrulhados em papel de alumínio. De seguida as amostras foram imersas em PBS ($\approx 5\text{ml}$), a 37°C durante 3 dias, 1 semana, 10 dias e 2 semanas. As amostras foram colocadas na estufa *Binder ED 115* que se encontra no laboratório de tratamentos térmicos na Universidade do Minho em Guimarães, a uma temperatura constante (temperatura fisiológica) durante os tempos de imersão anteriormente referidos. Após estes tempos, as amostras foram retiradas e pesadas em condições húmidas e secas de forma a se obter a percentagem de absorção de PBS assim como a perda de massa dos *scaffolds*, respetivamente [12].

Para calcular a absorção dos *scaffolds*, estes foram limpos com papel e foi pesada a sua massa húmida (m_h). A percentagem de absorção do PBS nos *scaffolds* foi calculada a partir da Equação 3.1:

$$\text{Absorção}_{\text{PBS}} = \frac{m_h - m_i}{m_i} \times 100 \quad \textbf{Equação 4.4}$$

Para avaliar a perda de massa devido à degradação dos *scaffolds*, as amostras foram secas na estufa a 37°C durante dois dias, sendo este o tempo em que o PBS é removido na totalidade, e de seguida procedeu-se à pesagem da sua massa seca (m_s). A percentagem de absorção dos *scaffolds* foi calculada a partir da Equação 3.2:

$$\text{Perda de massa}_{\text{scaffolds}} = \frac{m_i - m_s}{m_i} \times 100 \quad \textbf{Equação 4.5}$$

4.3 Referências bibliográficas

- [1] C. Brundle, C. Evans, and S. Wilson, *Encyclopedia of materials characterization*. Boston: Boston London Oxford, 1992.
- [2] M. P. Sepe, *Dynamic Mechanical Analysis*. USA: Plastics Design Library, 1998.
- [3] S. N. Cassu and M. I. Felisberti, "Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas," *Química Nova* vol. 28, pp. 255-263, 2005.
- [4] I. PerkinElmer, "Dynamic Mechanical Analysis (DMA) A Beginner ' s Guide Table of Contents," *A Beginner ' s Guide*, 2013.
- [5] W. E. Teo and S. Ramakrishna, "A review on electrospinning design and nanofibre assemblies," *Nanotechnology*, vol. 17, pp. R89-R106, Jul 28 2006.
- [6] R. Ramaseshan, S. Sundarajan, R. Jose, and S. Ramakrishna, "Nanostructured ceramics by electrospinning," *Journal of Applied Physics*, vol. 102, pp. 1-17, 2007.
- [7] P. Gill, T. T. Moghadam, and B. Ranjbar, "Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience," *Journal of biomolecular techniques : JBT*, vol. 21, pp. 167-193, 2010.
- [8] I. PerkinElmer, "Differential Scanning Calorimetry (DSC)," *A Beginner ' s Guide*, 2013.
- [9] T. L. Ogeda, "Ângulos de Contato," Universidade de São Paulo 2006.
- [10] Y. Yuan and T. R. Lee, "Contact Angle and Wetting Properties," vol. 51, pp. 3-34, 2013.
- [11] J. Grosseohme, "AfCS Solution Protocol," 2001.
- [12] M. V. Jose, V. Thomas, K. T. Johnson, D. R. Dean, and E. Nyairo, "Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering," *Acta Biomater*, vol. 5, pp. 305-315, Jan 2009.

Capítulo 5

Apresentação e discussão de resultados

5.1 Otimização dos parâmetros de processo de *electrospinning*

Como já referido, à técnica de *electrospinning* estão associados parâmetros de processo, sendo estes responsáveis pela morfologia e consequentemente pelas propriedades mecânicas das nanofibras. Deste modo, efetuaram-se testes de otimização dos parâmetros de processo do *electrospinning*, de forma a avaliar a influência destes na morfologia (diâmetro e alinhamento) das fibras. Neste sentido, foram estudados o campo elétrico, a distância entre o coletor e a extremidade da agulha, a taxa de fluxo e a velocidade de rotação do coletor. Para o presente estudo, as propriedades da solução utilizada e os parâmetros ambientais foram mantidos constantes. Importa salientar que para este estudo a solução utilizada foi de PVA uma vez que este polímero estava disponível no laboratório em maior quantidade.

Após a produção de cada amostra pela técnica de *electrospinning*, procedeu-se ao estudo da morfologia das fibras utilizando a técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM). De forma a estudar com maior detalhe a influência dos parâmetros de processamento no diâmetro e no alinhamento das fibras, realizou-se um estudo da distribuição de diâmetros para cada amostra. Este estudo consistiu, com recurso ao *software Image J*, no tratamento e no dimensionamento de 100 diâmetros de fibras de cinco imagens obtidas por SEM. Estas imagens foram retiradas de zonas diferentes do tapete das fibras. Com os diâmetros obtidos procedeu-se à realização de um gráfico de distribuição de diâmetros para cada amostra, de modo a averiguar se estes possuem uma distribuição uniforme e qual o intervalo de diâmetros médios.

a) Campo elétrico

Um dos requisitos dos *scaffolds* é a obtenção de diâmetros das fibras entre 50 e 500nm, como referido anteriormente. O campo elétrico é um dos parâmetros de processo do *electrospinning* que define o diâmetro das fibras. Para o estudo da alteração dos diâmetros das fibras com a variação do campo elétrico, foram produzidas quatro amostras com uma taxa de fluxo de 0,5ml/h, uma velocidade de rotação de 4000rpm, uma distância entre o coletor e a agulha de 10cm e um campo elétrico variável (18kV, 20kV, 23kV e 26kV). A deposição das fibras ocorreu durante 15 minutos. A Figura 5.1 representa as micrografias obtidas por SEM para cada amostra, bem como a respetiva análise da distribuição de diâmetros.

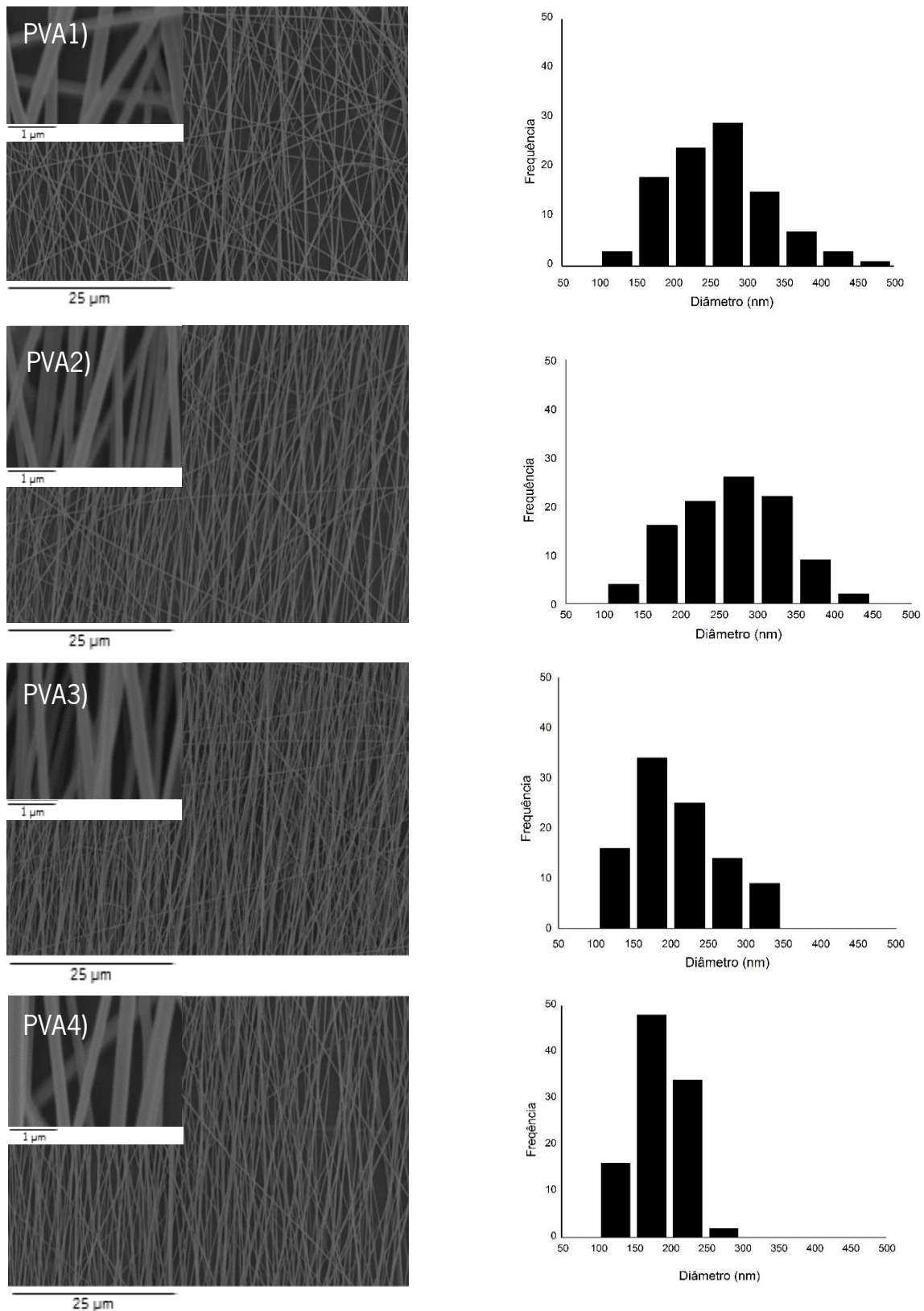
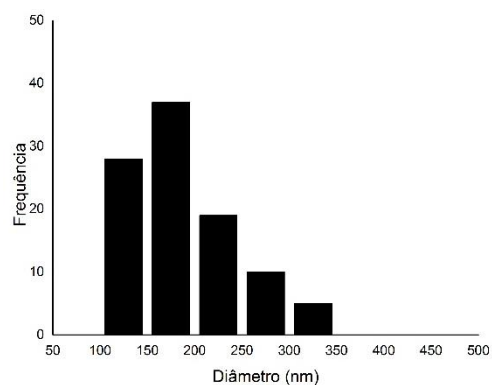
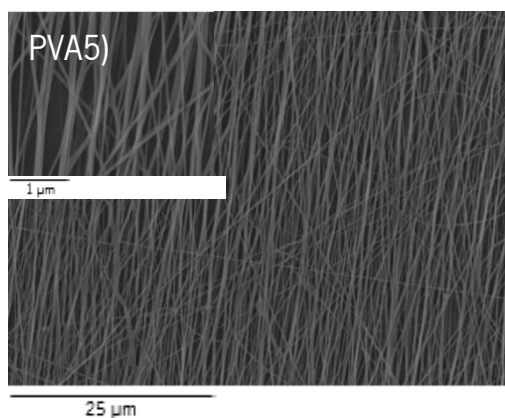
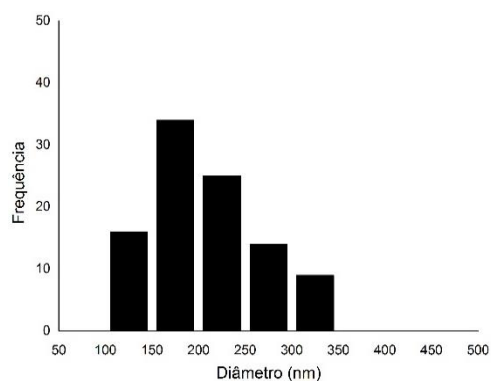
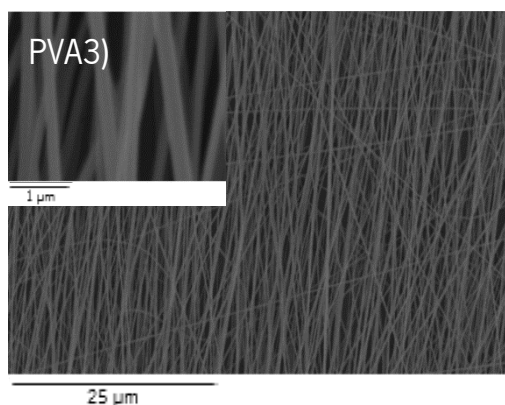


Figura 5.1- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x e gráfico de distribuição de diâmetros das amostras produzidas por *electrospinning* com uma taxa de fluxo de 0,5ml/h, uma velocidade de rotação de 4000rpm, uma distância entre o coletor e a agulha de 10cm e um campo elétrico (E) variável PVA1) E= 18kV, PVA2) E= 20kV, PVA3) E= 23kV e PVA4) E= 26kV

No que respeita o diâmetro das fibras, pode-se verificar através da observação da Figura 5.1, que o aumento do campo elétrico favorece a diminuição do diâmetro das fibras. Também é de realçar que associado à tendência de diminuição do diâmetro das fibras com o aumento do campo elétrico está a diminuição da distribuição dos diâmetros. Para além da diminuição do diâmetro das fibras com o aumento do campo elétrico, também é notório um aumento do alinhamento das fibras. Segundo Meghana V. Kakade [1], o aumento do campo elétrico tende a orientar as cadeias do polímero proporcionado assim um maior alongamento das fibras, formando uma estrutura de fibras alinhada e de diâmetros menores.

b) Distância entre o coletor e a agulha

A distância entre o coletor e a extremidade da agulha, tal como o campo elétrico, é um dos parâmetros de processo que afeta o diâmetro das fibras. Para o presente estudo foram produzidas quatro amostras, com uma taxa de fluxo de 0,5ml/h, uma velocidade de rotação de 4000rpm, um campo elétrico de 23kV e uma distância entre o coletor e a agulha variável (10cm, 13cm, 16cm e 20cm). A deposição das fibras foi realizada durante 15 minutos. A Figura 5.2 representa as micrografias obtidas por SEM para cada amostra, bem como a respetiva análise da distribuição de diâmetros.



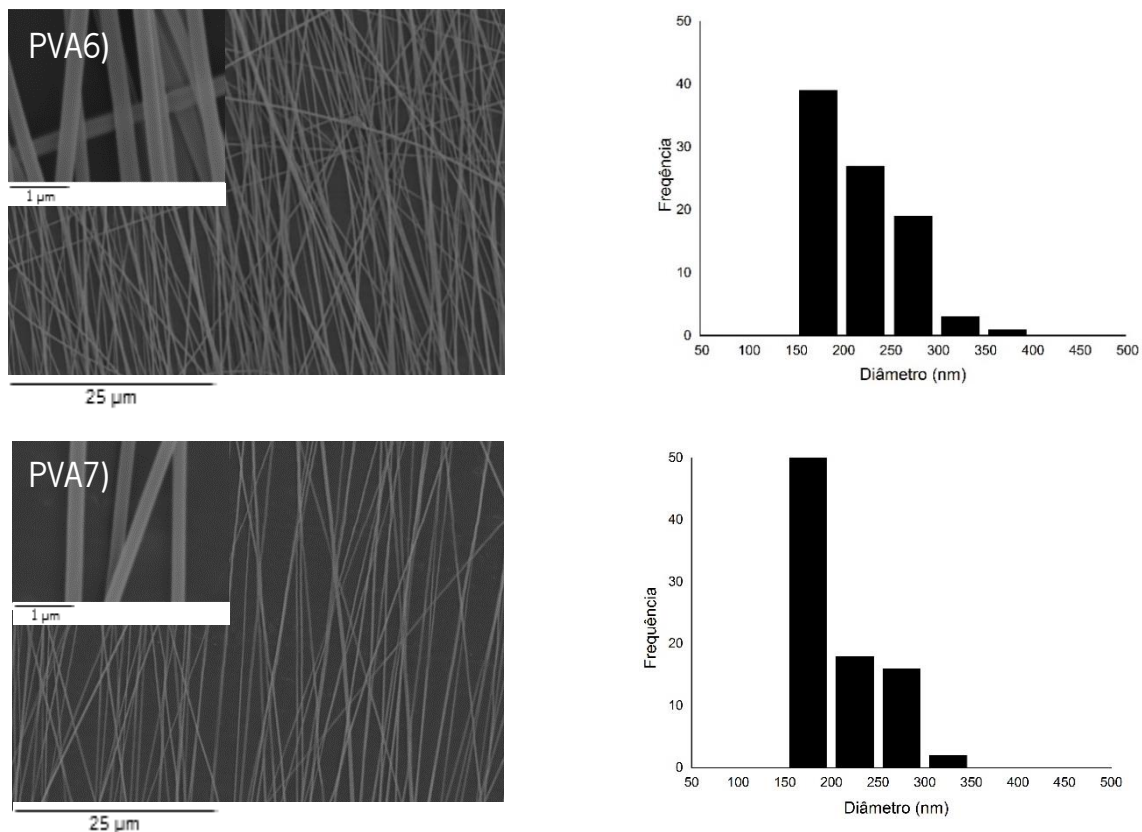
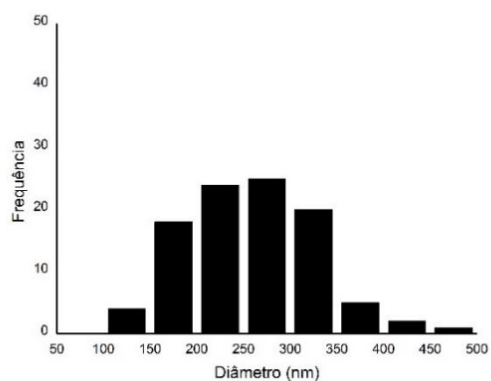
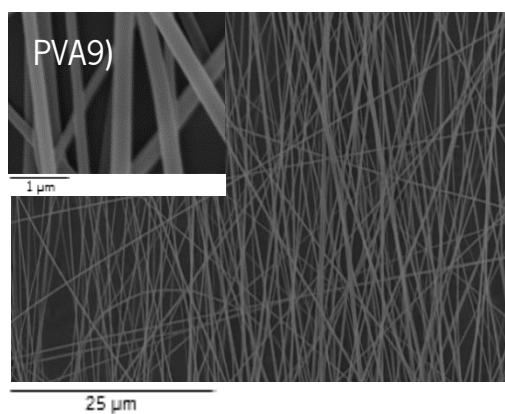
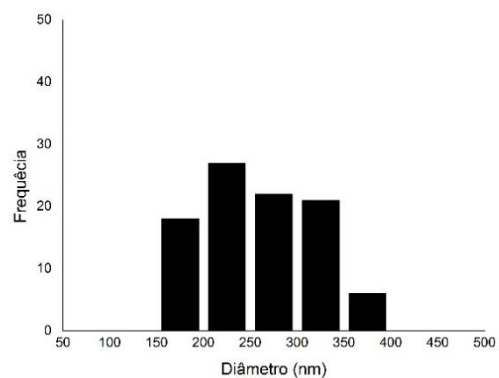
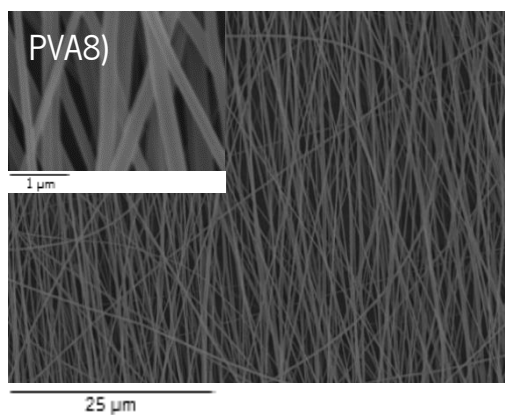
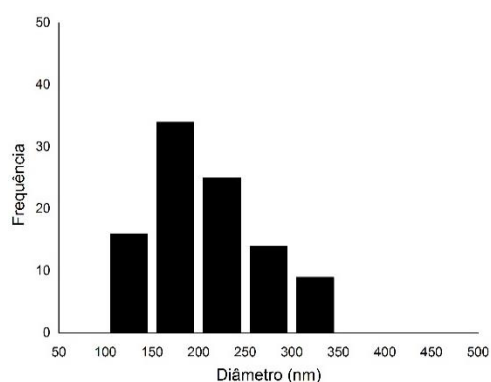
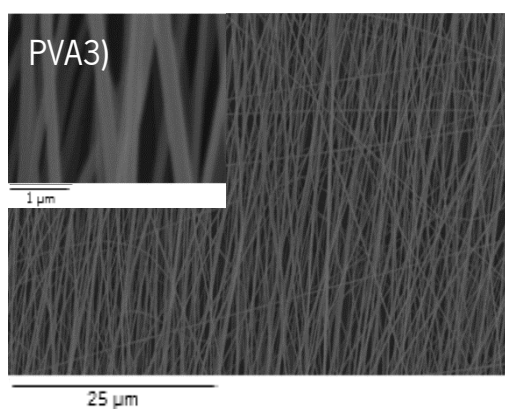


Figura 5.2- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x e gráfico de distribuição de diâmetros das amostras produzidas por *electrospinning* com uma taxa de fluxo de 0,5ml/h, uma velocidade de rotação de 4000rpm, um campo elétrico de 23kV e a distância entre o coletor e a extremidade da agulha (d) variável PVA3) d= 10cm, PVA5) d= 13cm, PVA6) d= 16cm e PVA7) d= 20cm

Pela observação da Figura 5.2, verifica-se que com o aumento da distância entre o coletor e a extremidade da agulha, o diâmetro das fibras tem tendência a diminuir, resultando uma maior frequência de diâmetros menores. Pode-se verificar que a amostra produzida a 10cm de distância entre o coletor e a extremidade da agulha tem uma menor frequência de diâmetros entre 250 e 300nm do que a amostra produzida com uma distância de 13cm. Isto deve-se a um maior estiramento das fibras pois o tempo de voo da fibra é maior. Contudo as amostras PVA6 e PVA7 (produzidas a uma distância de 16 e 20cm, respetivamente) revelam uma diminuição da quantidade de fibras depositadas, isto pode dever-se a uma maior instabilidade capilar, resultando numa deposição para toda a câmara e não apenas para o coletor (área analisada por SEM) [2].

c) Taxa de fluxo

Tal como o campo elétrico e a distância entre o coletor e a agulha, a taxa de fluxo da solução influencia o diâmetro das fibras. Neste âmbito, de modo a definir qual a influência da taxa de fluxo da solução no diâmetro das fibras, foram produzidas quatro amostras com uma velocidade de rotação de 4000rpm, uma distância entre o coletor e a agulha de 10cm, um campo elétrico de 23kV e uma taxa de fluxo variável (0,5ml/h, 1,5ml/h, 2,5ml/h e 3,5ml/h). As amostras foram produzidas durante 15 minutos. A Figura 5.3 representa as micrografias obtidas por SEM para cada amostra, bem como a respetiva análise da distribuição de diâmetros.



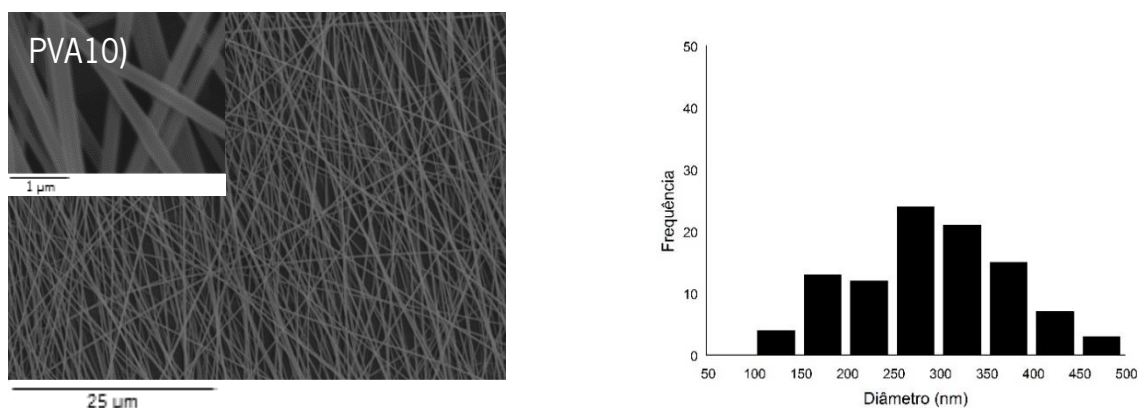


Figura 5.3- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x e gráfico de distribuição de diâmetros das amostras produzidas por *electrospinning* com uma velocidade de rotação de 4000rpm, uma distância entre o coletor e a agulha de 10cm, um campo elétrico de 23kV e uma taxa de fluxo (TF) variável PVA3) TF= 0,5ml/h, PVA8) TF= 1,5ml/h, PVA9) TF= 2,5ml/h e PVA10) TF= 3,5ml/h

Como se pode observar através da Figura 5.3, quanto maior a taxa de fluxo da solução maior será a tendência para o aumento do diâmetro das fibras. Para além do diâmetro das fibras ser maior também é possível denotar, uma diminuição do grau de alinhamento destas. Neste sentido, quanto maior a taxa de fluxo maior a quantidade de solvente para evaporar, originando assim um diâmetro de fibras maior, comparativamente às fibras obtidas com taxas de fluxo inferior. Segundo Vincent Milleret [3], com uma menor taxa de fluxo (ml de solução por hora menor), a quantidade de solvente utilizada também é menor, e por conseguinte, as fibras endurecem mais rapidamente, pois a quantidade de solvente a evaporar é menor para o mesmo tempo de voo. Assim possuem uma menor propensão para a flexão, durante o tempo de voo originando assim fibras mais alinhadas.

Para além do aumento da taxa de fluxo, para um campo elétrico constante, provocar um aumento do diâmetro das fibras, também provoca o fenómeno de gotejamento sobre o tapete das fibras. Assim, uma variação da taxa de fluxo demonstra a necessidade de um ajuste no campo elétrico de forma a não ocorrer gotejamento. Estas gotas são derivadas da falta de capacidade de estiramento de toda a solução pelo campo elétrico tendo em consideração a taxa de fluxo utilizada. O tapete de fibras com as gotas, de cada amostra, foram observados em SEM, como demonstrado na Figura 5.4.

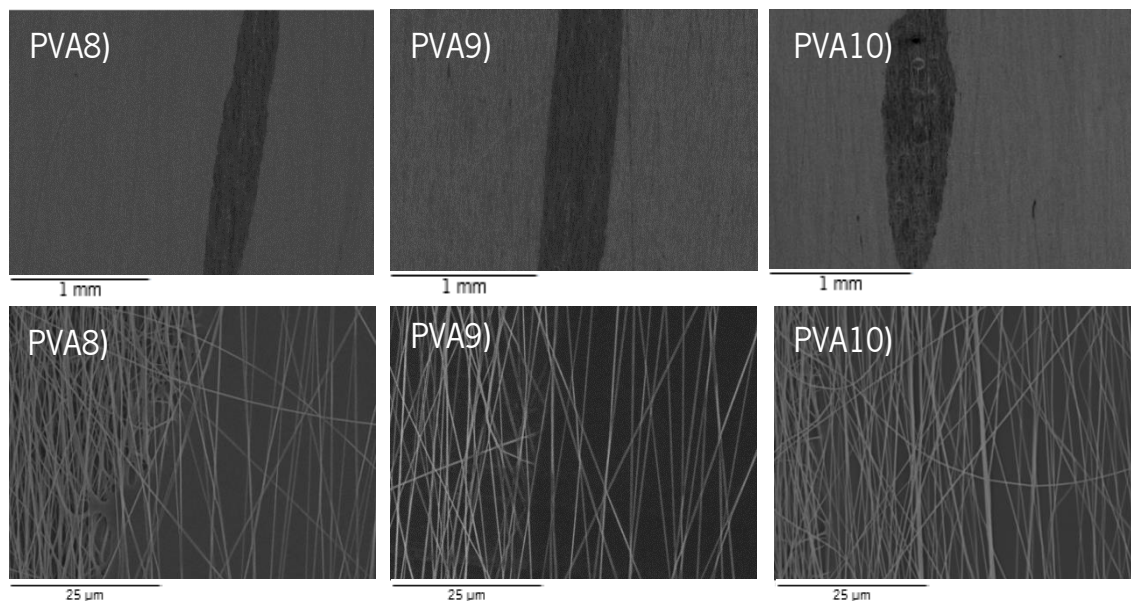
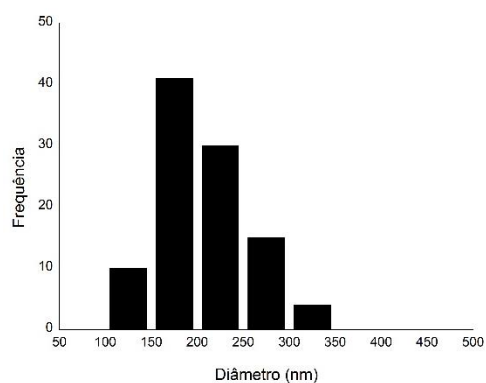
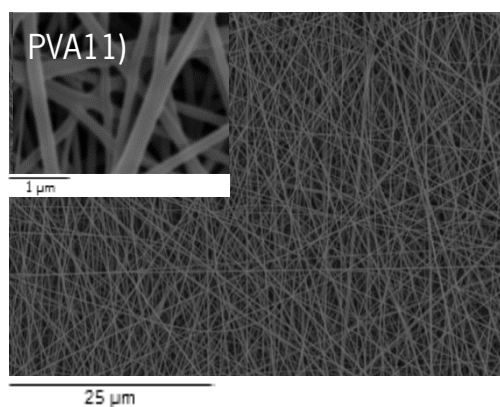


Figura 5.4- Micrografias SEM a uma ampliação de 500x e 2000x das bolhas das amostras PVA8), PVA9) e PVA10)

Na Figura 5.4 as micrografias com ampliação de 500x apresentam a existência de gotas no tapete das fibras. Nas micrografias a 2000x verifica-se que as gotas ao molharem o tapete de fibras provocam uma variação da densidade das fibras, pois estas gotas não deixam que sejam depositadas fibras sobre elas.

d) Velocidade de rotação do coletor

Para o estudo da variação da morfologia das fibras com a velocidade de rotação do coletor, foram produzidas quatro amostras (Figura 5.5) durante 15 minutos, com uma taxa de fluxo da solução de 0,5ml/h, um campo elétrico de 23kV, uma distância entre o coletor e a extremidade da agulha de 10cm e uma velocidade de rotação do coletor variável (900rpm, 1900rpm, 3400rpm e 4000rpm).



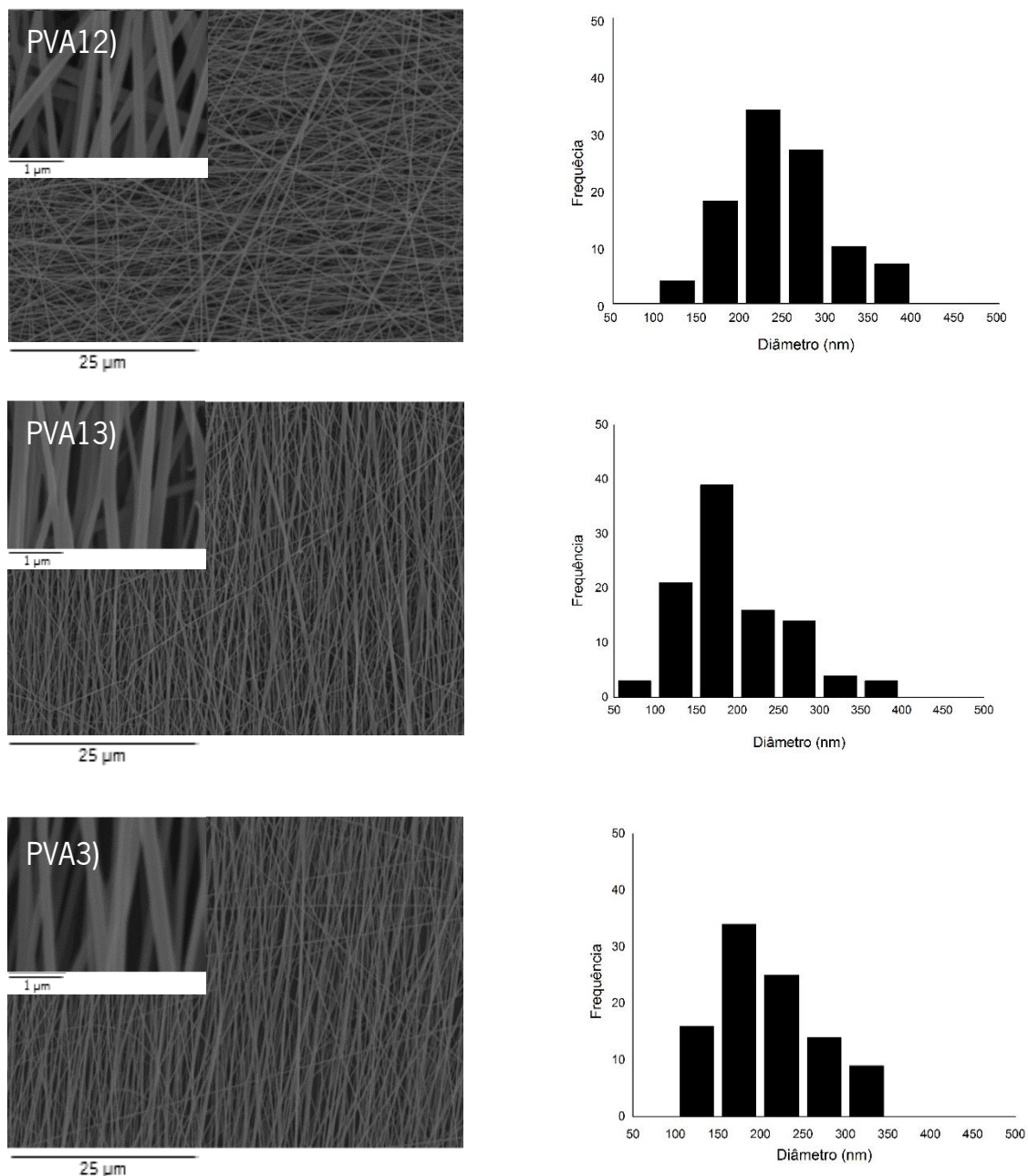


Figura 5.5- Micrografias SEM a uma ampliação de 2000x e 35000x e gráfico de distribuição de diâmetros para as amostras produzidas por *electrospinning* com uma taxa de fluxo da solução de 0,5ml/h, um campo elétrico de 23kV, uma distância entre o coletor e a extremidade da agulha de 10cm e uma velocidade de rotação do coletor (v) variável PVA11) $v = 900\text{rpm}$, PVA12) $v = 1900\text{rpm}$, PVA13) $v = 3400\text{rpm}$ e PVA3) $v = 4000\text{rpm}$

Como é possível verificar através da Figura 5.5, quanto maior a velocidade de rotação do coletor maior é o alinhamento das fibras. Z. M. Huang [4] afirma que o alinhamento das fibras é conseguido quando se atinge um equilíbrio entre a velocidade de deposição das fibras e a velocidade tangencial do cilindro (0,036m/s para o presente estudo). Se a velocidade tangencial do cilindro for baixa ($<0,007\text{m/s}$), o coletor tem um comportamento igual ao coletor plano, originando uma malha de fibras depositadas de forma

aleatória. A velocidades superiores a 3000rpm o alinhamento é favorável. A variação do diâmetro não é significativa com a alteração da velocidade de rotação do coletor, como se pode observar a Figura 5.5.

O alinhamento das fibras é um dos requisitos pretendidos para os *scaffolds*, como referido no capítulo 2 secção 2.3.4.1. O parâmetro que melhor define este requisito é a velocidade de rotação do coletor. No entanto, segundo W. E. Teo [5] este também depende do tipo de coletor utilizado, afirmando que se consegue obter fibras alinhadas com velocidades inferiores, através de um sistema com um coletor rotativo com um fio condutor, do que com um sistema de coletor rotativo convencional.

Para o estudo do alinhamento das fibras consoante o tipo de coletor, foi colocado um fio condutor (fio de cobre) na superfície do coletor rotativo convencional, de modo a estudar o comportamento morfológico das fibras no coletor e na zona onde se encontra o fio. A amostra foi produzida com uma taxa de fluxo da solução de 0,5ml/h, um campo elétrico de 23kV, uma distância entre o coletor e a extremidade da agulha de 10cm e uma velocidade de rotação de 4000rpm durante 15 minutos. A micrografia SEM da amostra nas duas zonas está apresentada na Figura 5.6.

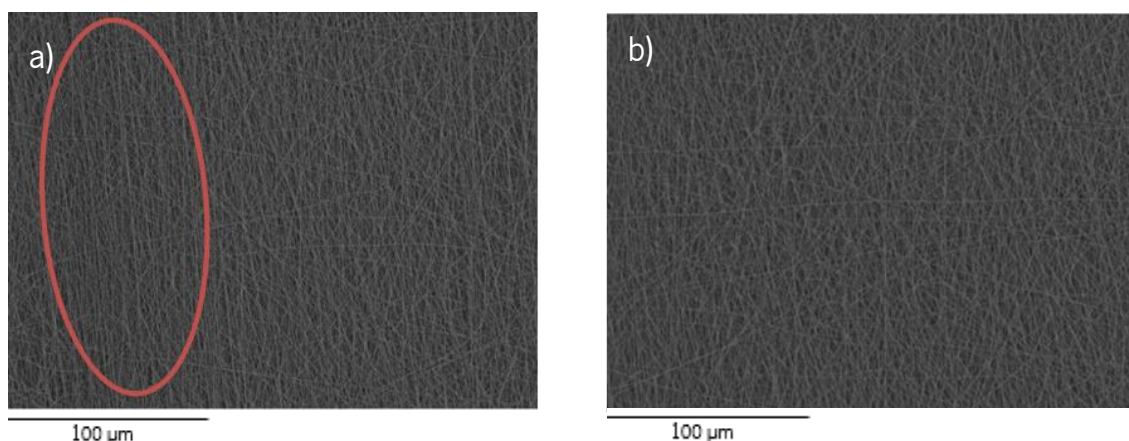


Figura 5.6- Micrografias SEM com uma ampliação de 500x para a amostra produzida por *electrospinning* na zona do coletor a) com fio de cobre e b) sem fio de cobre

Através da análise da Figura 5.6, é possível identificar um grau de alinhamento das fibras superior na zona onde se encontra o fio de cobre no coletor. Quando é colocado o fio condutor no coletor, devido à sua condução, o jato de fibras vai ser depositado preferencialmente sobre o fio, as fibras têm tendência a se depositarem com o alinhamento do fio. Contudo este alinhamento só é conseguido à superfície do fio e a área de fibras alinhadas está condicionada ao diâmetro do fio utilizado (2,05mm).

Pela análise atenta das micrografias representativas de cada amostra produzida, e tendo por base que para o presente trabalho pretende-se uma distribuição de diâmetros uniforme assim como um elevado grau de alinhamento nas fibras, pode-se agora inferir qual a influência dos parâmetros na morfologia das fibras. Com o aumento do campo elétrico e da distância entre o coletor e a extremidade da agulha, o diâmetro das fibras tem tendência para diminuir. O aumento da taxa de fluxo provoca uma tendência de aumento do diâmetro das fibras. O aumento da velocidade de rotação do coletor não tem influência significativa no diâmetro das fibras. De forma a ter um grau de alinhamento elevado, o campo elétrico utilizado deverá ser elevado, assim como a distância entre o coletor e agulha e a velocidade de rotação do coletor. O aumento da taxa de fluxo requer um ajuste no campo elétrico, uma vez que estes dois parâmetros estão associados. O coletor rotativo com um fio de cobre origina um maior grau de alinhamento das fibras do que o coletor rotativo convencional, contudo o alinhamento apenas é verificado na superfície do fio. Deste modo, a utilização de um coletor rotativo com um fio de cobre não demonstra benefícios significativos.

Doravante a caracterização efetuada refere-se às nanofibras produzidas com a solução de PLGA e HFP em diferentes rácios dos monómeros de PLGA (PGA/PLA) onde se terá em consideração o estudo realizado de como influenciam os parâmetros de processo a morfologia das fibras (diâmetro e alinhamento).

5.2 Caracterização dos *scaffolds* de PLGA

Após a produção dos *scaffolds* de PLGA para ambos os rácios dos monómeros que o constituem (85/15 e 75/25), estes foram submetidos a caracterização morfológica e mecânica. Importa sublinhar que pretende-se obter fibras com morfologia alinhada com um intervalo de diâmetros entre 50 a 500nm que resulte nas propriedades mecânicas semelhantes às do osso, sendo o módulo de Young entre o valor 0,1 e 5GPa e uma porosidade de 50% a 90%.

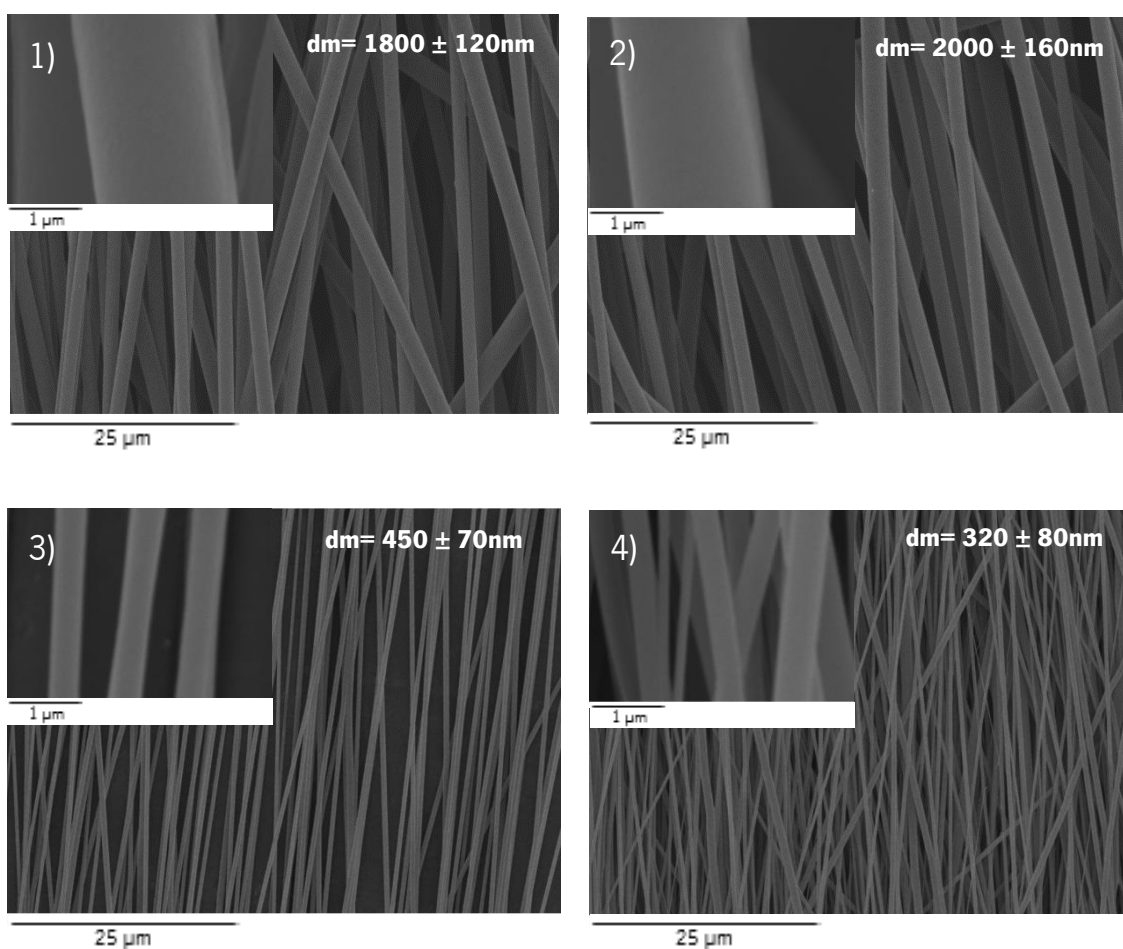
5.2.1 Caracterização morfológica

Os parâmetros de processamento e as propriedades da solução desempenham um papel muito importante na morfologia (diâmetro e porosidade) das nanofibras que consequentemente afetam as suas propriedades mecânicas. Neste contexto, o diâmetro das fibras dos *scaffolds* produzidos por *electrospinning* foi estudado com recurso à análise realizada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

Na Tabela 5.1 estão apresentados a concentração das soluções e os parâmetros do processo *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de PLGA 85/15 e, na Figura 5.7 estão apresentadas as imagens de SEM para cada amostra de *scaffolds* de PLGA 85/15.

Tabela 5.1- Concentração das soluções e parâmetros do processo *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de *scaffolds* de PLGA 85/15

Amostra	Concentração da solução [g/ml]	Taxa de fluxo (ml/h)	Velocidade de rotação do coletor (rpm)	Campo elétrico (kV)	Distância entre o coletor e a agulha (cm)
1	0,16	3	3500	13	20
2				11	
3	0,08	0,5	3900	13	20
4				18	

**Figura 5.7-** Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x das amostras de PLGA 85/15

A amostra 1 apresentada na Figura 5.7 foi realizada tendo em conta os parâmetros utilizados no estudo de W. E. Teo [5]. Pela observação da Figura 5.7, é notório um grau de alinhamento elevado para todas as amostras isto deve-se à elevada velocidade de rotação do coletor utilizada (3500 e 3900rpm).

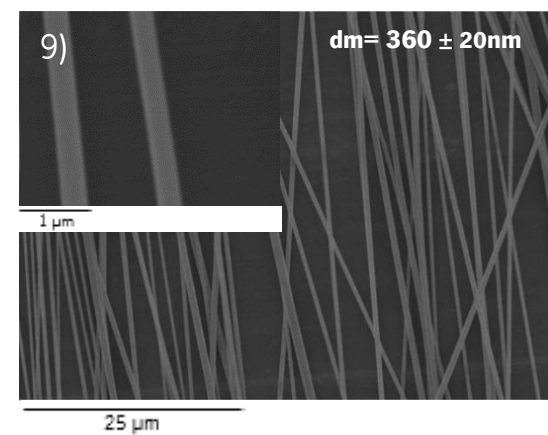
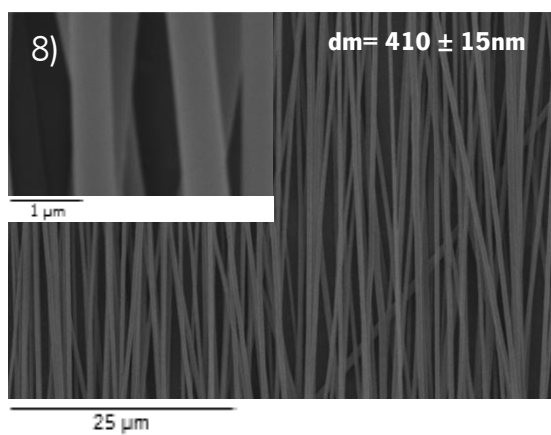
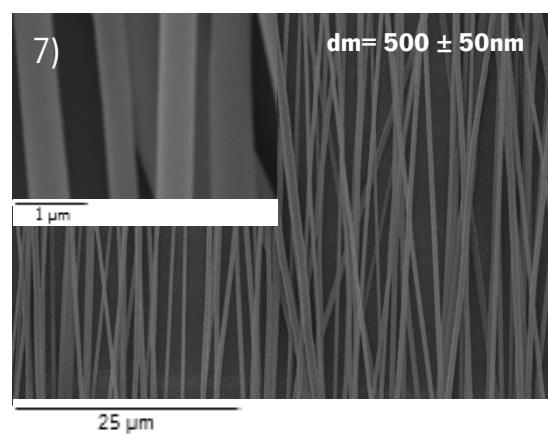
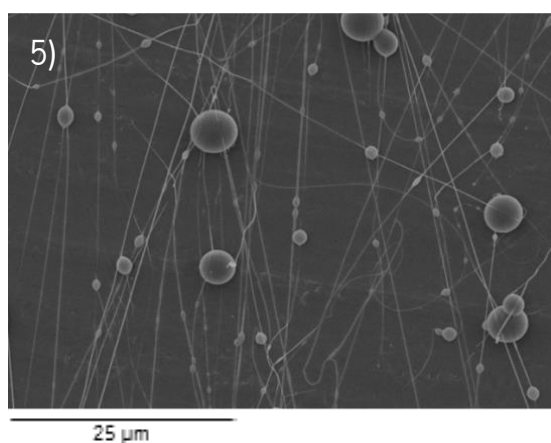
Pela análise da Figura 5.7 também é notório, um diâmetro médio superior para a amostra 1 comparativamente à amostra 2, este aumento é o resultado da diminuição do campo elétrico utilizado no sistema de *electrospinning*. Estas amostras (1 e 2) apresentam diâmetros médios elevados tendo em conta os requisitos pretendidos para os *scaffolds* (50 e 500nm). Os diâmetros médios elevados podem ser resultado de solvente ainda existente nas fibras, posto isto, a amostra 1 foi colocada na estufa como forma de eliminar o possível solvente existente nas fibras. A temperatura utilizada foi de 60°C, sendo que a temperatura de ebulição do HFP é de 59°C. Após quatro horas, a amostra foi retirada da estufa e analisada por SEM. Após a sua visualização verificou-se que o diâmetro médio das fibras se manteve. De forma a comprovar esta teoria a composição química da amostra foi analisada através de EDS e como era espectável, verificou-se que a amostra apenas contém carbono, oxigénio, hidrogénio e ouro. O carbono, oxigénio e o hidrogénio são os elementos constituintes do polímero, o ouro foi o material utilizado para o revestimento da amostra. Estes testes revelam que as fibras não apresentam a existência de solvente (HFP) pois não demonstram conter fósforo nem potássio.

As fibras referentes às amostras 1 e 2 revelam um diâmetro superior ao pretendido (50-500nm). Neste sentido, como forma de se diminuir o diâmetro médio das fibras, foram realizadas as amostras 3 e 4, com uma solução de concentração inferior, como referido na Tabela 5.1. Para além da concentração, também foi alterada a taxa de fluxo de 3 para 0,5ml/h, pois no estudo da otimização de parâmetros de *electrospinning* é evidente a diminuição do diâmetro das fibras com a diminuição da taxa de fluxo utilizada. Através da análise das micrografias SEM das amostras 3 e 4 representadas na Figura 5.7, verifica-se uma diminuição dos diâmetros médios das fibras comparativamente às amostras 1 e 2. Comprovando, mais uma vez, uma tendência de diminuição do diâmetro médio das fibras com o aumento do campo elétrico e com a diminuição da taxa de fluxo. A amostra 4 foi a que apresentou um diâmetro médio menor, deste modo será esta a utilizada para as caracterizações posteriores.

Após o estudo das nanofibras de PLGA 85/15, foi realizado o mesmo para as nanofibras de PLGA 75/15. Na Tabela 5.2 estão apresentados a concentração das soluções e os parâmetros do processo *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de PLGA 75/25 e, na Figura 5.8 estão apresentadas as imagens de SEM para cada amostra de *scaffolds* de PLGA 75/25.

Tabela 5.2- Concentração das soluções e parâmetros do processo *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de *scaffolds* de PLGA 75/25

Amostra	Concentração da solução [g/ml]	Taxa de fluxo (ml/h)	Velocidade de rotação do coletor (rpm)	Campo elétrico (kV)	Distância entre o coletor e a agulha (cm)
5	0,08	0,5	3900	14	20
6				19	
7	0,15	0,5	3900	14	20
8				18	
9	0,13	0,5	3800	14	20
10				18	



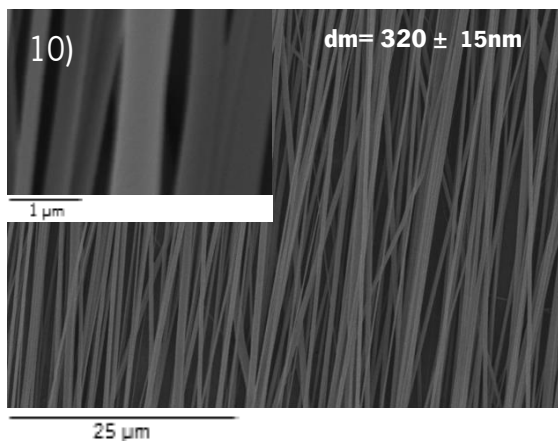


Figura 5.8- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x das amostras de PLGA 75/25

A amostra 5 foi produzida tendo em consideração a concentração satisfatória (0,08g/ml) para as amostras de PLGA 85/15, e pela observação das micrografias apresentadas na Figura 5.8, verifica-se que esta amostra não apresenta uma morfologia fibrosa mas sim de micro gotas. O mesmo se verificou para a amostra 6 (imagem não apresentada). Isto deve-se ao facto da viscosidade da solução não ser suficientemente elevada para produzir fibras, resultando apenas num jato de micro gotas. A viscosidade da solução poderá ser inferior a uma mesma concentração pois a massa molecular do PLGA 75/25 (66.000-107.000) é inferior à massa molecular do PLGA 85/15 (190.000- 240.000) tornando assim a solução mesmo viscosa a concentrações iguais.

Com o intuito de se conseguir obter uma estrutura fibrosa, a concentração da solução foi aumentada, como indicado na Tabela 5.2. Posto isto, com a solução de concentração 0,15g/ml foram produzidas as amostras 7 e 8 com campos elétricos diferentes, onde se comprova mais uma vez que o aumento do campo elétrico estimula uma diminuição do diâmetro das fibras. Apesar dos valores dos diâmetros estarem entre os valores pretendidos estes encontram-se próximos do limite assim, de forma a se reduzir o diâmetro médio das fibras, foram produzidas as amostras 9 e 10 com uma solução de concentração inferior (0,13g/ml). Pela análise das micrografias representadas na Figura 5.8, é possível verificar que a amostra 10 é a que revela diâmetros mais reduzidos, assim esta será a amostra utilizada para as caracterizações posteriores.

Após a escolha das amostras das fibras de PLGA a utilizar para as caracterizações seguintes, fez-se um estudo mais detalhado do diâmetro médio das fibras de cada amostra através de um gráfico de distribuição. Os gráficos estão representados na Figura 5.9 e foram realizados com o auxílio do *software ImageJ*.

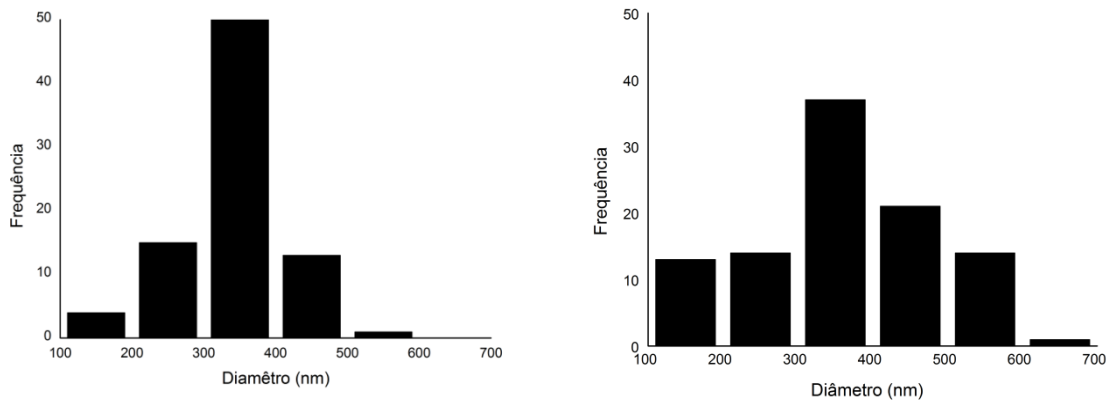


Figura 5.9- Gráficos de distribuição de diâmetros para a) amostra 4 de PLGA 85/15, b) amostra 10 de PLGA 75/25

Como se pode ver na Figura 5.9, os diâmetros médios das amostras de PLGA 85/15, PLGA 75/25 estão dentro do intervalo requerido para os *scaffolds* (50-500nm). Contudo a amostra que apresenta uma distribuição de diâmetros mais uniforme e que apresenta uma distribuição de diâmetros em intervalos com valores de diâmetros menores é a amostra 4 de PLGA 85/15.

A porosidade é outra propriedade morfológica que define o desempenho dos *scaffolds*. Esta propriedade nas nanofibras para *scaffolds* permite difundir os nutrientes, facilitando a regeneração óssea e ao mesmo tempo, atua como barreira de matérias indesejadas para o tecido cicatricial [6].

A determinação da porosidade (Equação 5.2) teve por base a equação da densidade aparente do *scaffold* ($d_{aparente\ scaffold}$) como apresentado na Equação 5.1[7].

$$d_{aparente\ scaffold} = \frac{massa}{\text{área} \times espessura} \left(\frac{g}{cm^3} \right) \quad \text{Equação 5.1}$$

$$Porosidade = 1 - \frac{d_{aparente\ scaffold}}{d_{bulk}} (\%) \quad \text{Equação 5.2}$$

Para o cálculo da densidade aparente do *scaffold*, a massa utilizada foi a obtida pela balança de precisão *Perkin Elmer AD 4 autobalance* (que se encontra no Laboratório de Ciência de Polímeros, da Universidade

do Minho em Guimarães) e, tanto a área como a espessura foram as utilizadas no ensaio de DMA (secção 5.2.2). A densidade *bulk* (d_{bulk}) é definida como a razão entre a massa das partículas do material e do volume que esta ocupa. O volume total compreende o volume das partículas, volume vazio entre partículas e o volume dos poros internos. Segundo a literatura [8, 9], o valor da densidade de *bulk* para o PLGA de ambas as proporções é de 1,25g/cm³. Na Tabela 5.3, estão definidos os valores utilizados para o cálculo da densidade aparente e a respetiva porosidade para as amostras referentes a cada proporção de PLGA.

Tabela 5.3- Valores utilizados para o cálculo da densidade aparente e a respetiva porosidade para as amostras 4 de PLGA 85/15 e amostra 10 de PLGA 75/25

	PLGA 85/15	PLGA 75/25
Massa (mg)	2,80	2,77
Área (cm²)	1,75	1,75
Espessura (μm)	99,70	92,40
Densidade aparente (g/cm³)	0,16	0,17
Porosidade (%)	87,18 ± 1,1x10 ⁴	86,31 ± 4,3x10 ⁴

Pela análise da Tabela 5.3, verifica-se que a porosidade relativa às amostras PLGA 85/15 e PLGA 75/25 encontra-se entre o intervalo de porosidade pretendido (50%-90%). Assim ambas as amostras revelam resultados promissores para a sua utilização como *scaffolds*, no que concerne a porosidade.

5.2.2 Caraterização mecânica

A caraterização mecânica foi realizada com o objetivo de se estudar o módulo de Young (equivalente ao módulo de armazenamento) dos *scaffolds*. O módulo de Young é caracterizado pela capacidade que um material tem de se deformar elasticamente traduzindo-se numa propriedade crucial para o bom desempenho do *scaffold*. Este valor terá de ser semelhante ao do osso de forma a desempenhar a sua função quando implantado no corpo humano.

Com o objetivo de se conseguir uma espessura adequada (> 50μm), com vista a facilitar o manuseamento das fibras para a realização desta caraterização num equipamento de DMA, foi necessário produzir amostras durante quatro horas no sistema *electrospinning*. Antes de efetuar o ensaio de DMA as fibras foram cortadas com uma área definida (1,75cm²) com o auxílio de uma lâmina, e foram colocadas no equipamento entre duas amarras, como demonstrado na Figura 5.10. Após a calibração do equipamento foram inseridos todos os parâmetros do ensaio (temperatura, frequência e força) e da amostra (espessura, geometria e área) no *software* de análise do equipamento.

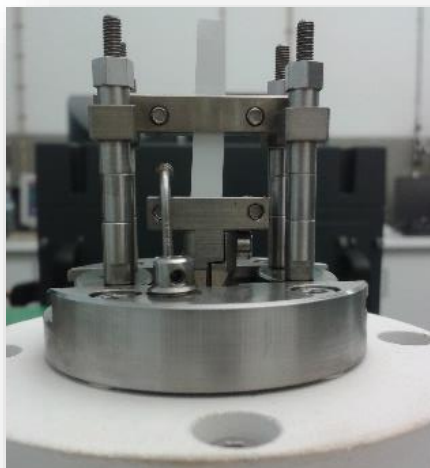


Figura 5.10- Amostra colocada entre as amarras no equipamento de DMA

De forma a controlar a área das amostras, estas foram produzidas sobre uma cartolina quadriculada sobre o papel de alumínio, assim as amostras foram cortadas com uma área conhecida. A medição da espessura inicialmente foi realizada através da visualização da zona transversal da amostra em SEM. Neste sentido, as fibras foram cortadas com o auxílio de azoto líquido, contudo a visualização em SEM da espessura das fibras tem um grande erro de leitura associado, porque o corte não é linear, como demonstrado na Figura 5.11.

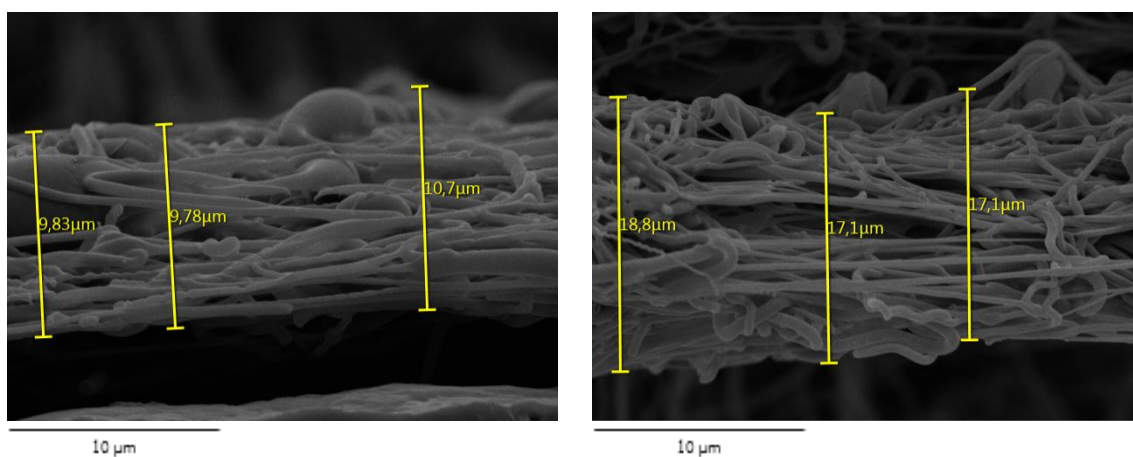


Figura 5.11- Micrografias SEM em secção transversal com uma ampliação de 3500x da amostra 4 de PLGA 85/15

De forma a diminuir o erro de leitura da espessura das fibras, esta foi medida com o auxílio do micrómetro *Mitutoyo 0,001 mm ip 54*. Onde primeiramente se mediu a espessura da cartolina e do papel de alumínio

e de seguida mediu-se a espessura da cartolina, do papel de alumínio e das fibras. A espessura das fibras resultante é a subtração das duas medições.

A Figura 5.12 representa o módulo de armazenamento quando sujeito a diferentes frequências (0,1 a 100Hz), simulando as frequências a que o osso está sujeito [10, 11], para cada amostra (amostra 4 de PLGA 85/15 e amostra 10 de PLGA 75/25).

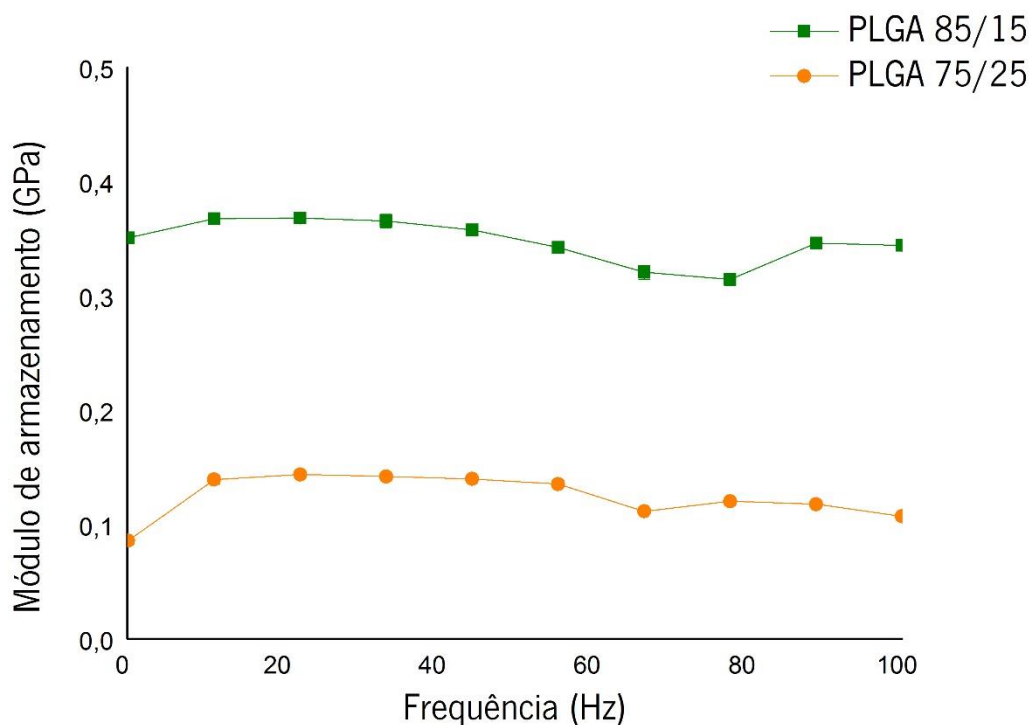


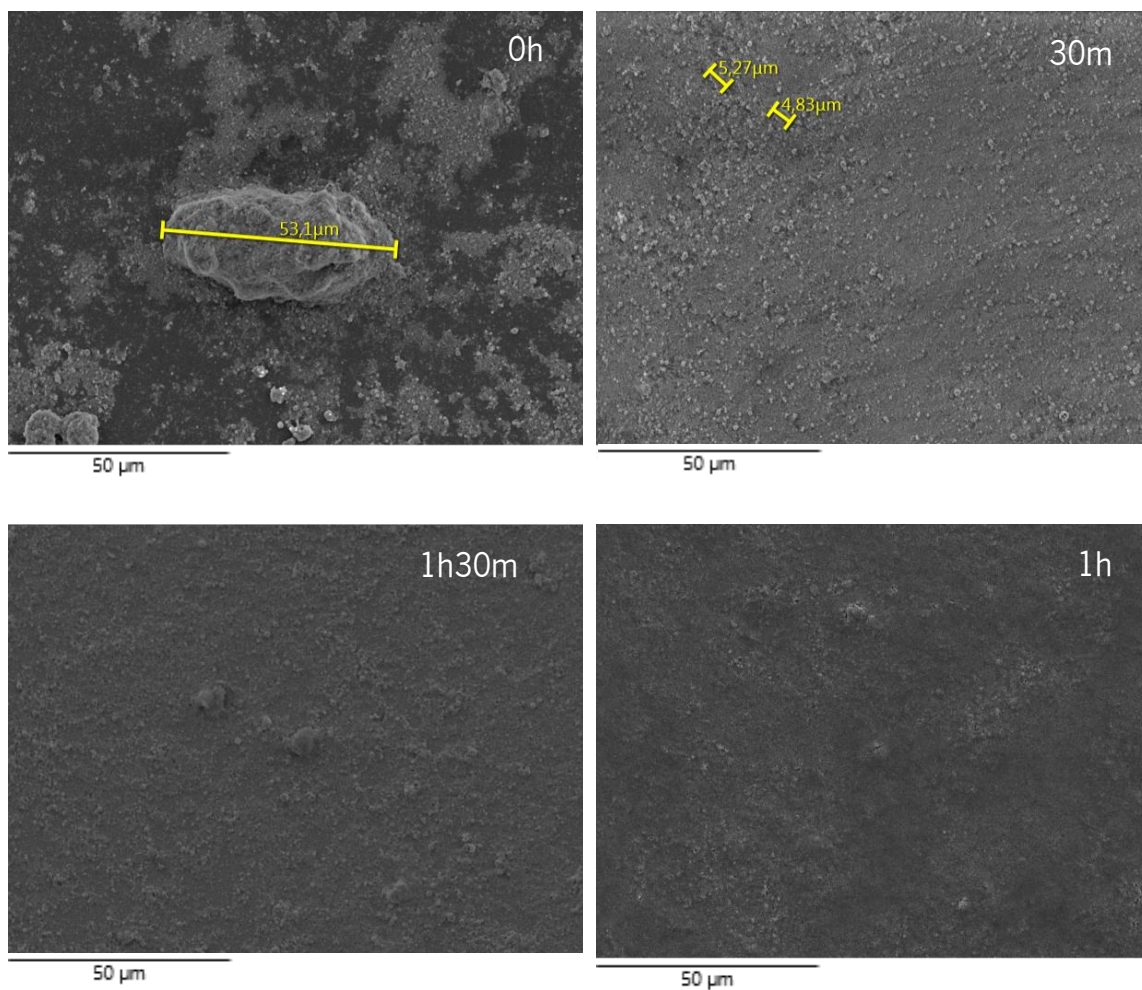
Figura 5.12- Gráfico da variação do módulo de armazenamento com a frequência aplicada para a amostra 4 de PLGA 85/15 e a amostra 10 de PLGA 75/25

Na Figura 5.12 é possível identificar valores distintos do módulo de armazenamento para o PLGA consoante a sua proporção. Contudo era esperado que o valor do módulo de armazenamento aumenta-se com o aumento da frequência aplicada, pois a altas frequências o material comporta-se como vítreo, ou seja é rígido devido aos altos tempos de relaxação, assim resultam maiores módulos de armazenamento [12]. A uniformidade do módulo de armazenamento com a variação da frequência pode dever-se à estrutura das amostras [13]. O PLGA 85/15 é o que revela um módulo de armazenamento mais semelhante ao osso do corpo humano (0,1-5GPa). Este resultado era o espectável, pois esta proporção possui uma maior percentagem do polímero PLA demonstrando um comportamento mais rígido. Neste sentido, tendo em conta os resultados referentes às propriedades mecânicas, a amostra de PLGA 85/15 apresenta resultados promissores para a sua utilização como *scaffold*.

5.3 Desaglomeração das nanopartículas de HA

Para o estudo do tempo ideal de desaglomeração das nanopartículas de HA, foram retiradas amostras de 1µl das soluções (HFP e 1% e 5%) após 0h, 30m, 1h e 1h30m e de 1 em 1 hora até 6 horas de desaglomeração. As amostras foram retiradas com o auxílio de uma pipeta para uma lâmina de vidro à temperatura ambiente e após a evaporação do solvente estas foram visualizadas em SEM.

A Figura 5.13 representa as micrografias obtidas por SEM dos vários tempos de desaglomeração das nanopartículas de HA, da solução HFP e 1% de HA.



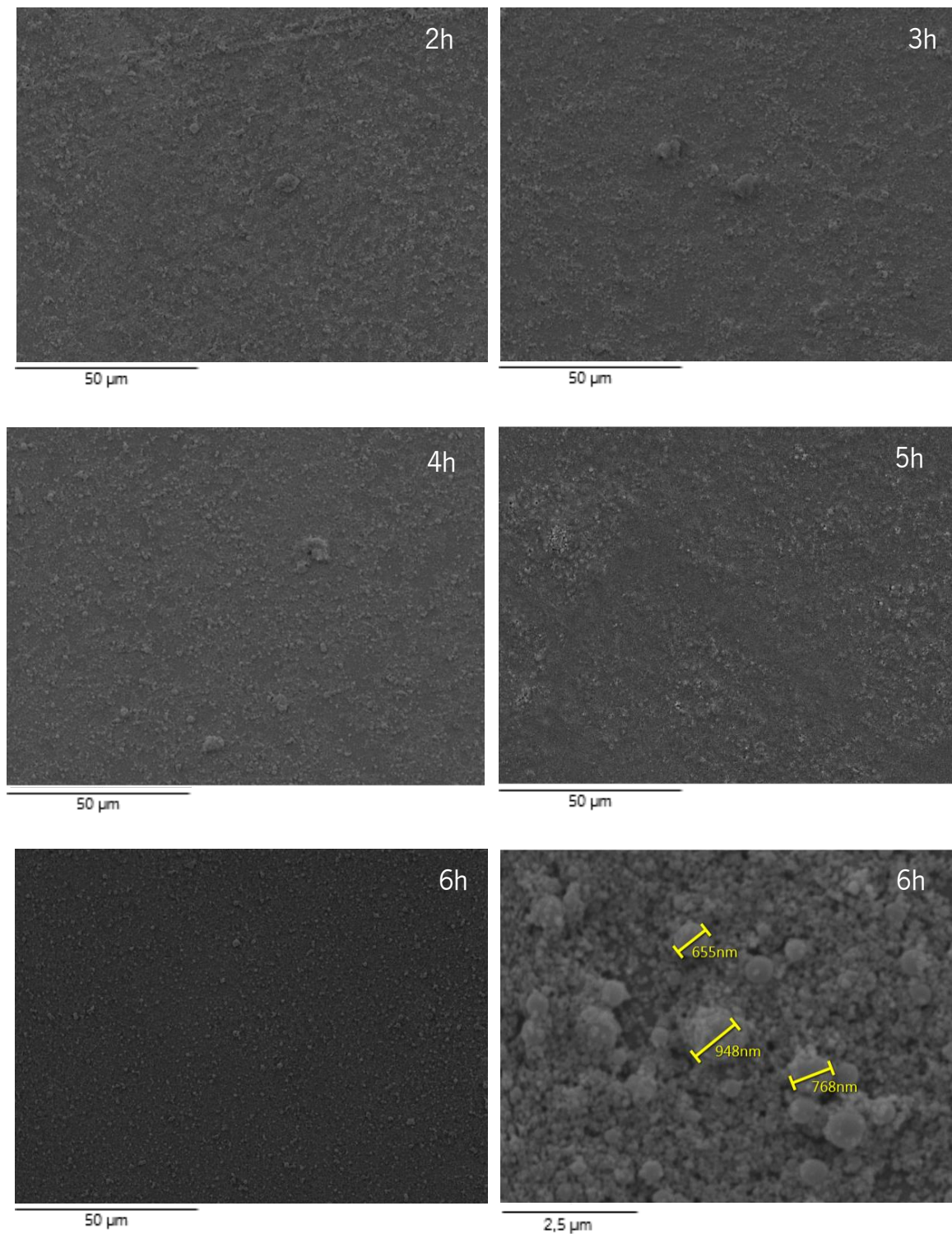


Figura 5.13- Micrografias SEM com uma ampliação de 1000x dos vários tempos de desaglomeração das nanopartículas de HA da solução HFP e 1% de HA e sendo a última micrografia SEM com uma ampliação de 5000x a 6h de desaglomeração das nanopartículas de HA da solução HFP e 1% de HA

Pela análise da Figura 5.13 verifica-se que os aglomerados de HA diminuem de tamanho com o aumento do tempo de imersão da solução no banho de ultrassons. Pela observação das micrografias é notório que

a partir de duas horas de imersão da solução no banho, a dispersão das nanopartículas de HA é satisfatória demonstrando poucas “ilhas” de aglomerados. Não havendo uma melhoria significativa da desaglomeração das nanopartículas de HA com um tempo de imersão da solução no banho de ultrassons, superior a duas horas. Deste modo, duas horas de imersão no banho de ultrassons revela ser o tempo ideal para se conseguir a desaglomeração das nanopartículas de HA na solução. As micrografias das amostras da solução de 5% de HA adicionadas ao HFP (Anexo II) demonstram que o aumento do teor de nanopartículas de HA não necessita de um maior tempo de imersão das soluções no banho de ultrassons. Deste modo, de igual forma para a solução de 5% HA e HFP o tempo ideal para a desaglomeração das nanopartículas é de duas horas.

Pela análise da última micrografia da Figura 5.13 é possível denotar que as nanopartículas de HA não demonstram uma granulometria uniforme, sendo que alguns pós demonstram ter um diâmetro de aproximadamente 800nm ou até mesmo 900nm. As fibras do PLGA 85/15, como verificado pela caracterização morfológica, apresentam um diâmetro médio de 300 a 400nm, assim os pós com dimensões de diâmetros superiores ao das fibras vão afetar a uniformidade da sua estrutura fibrosa. O que poderá influenciar negativamente nas propriedades mecânicas das nanofibras.

5.4 Caraterização dos *scaffolds* de PLGA e HA

Tendo por base os resultados da caraterização morfológica, mecânica e estrutural referentes às duas proporções do polímero PLGA, o polímero que revelou resultados mais promissores para a sua utilização como *scaffold* foi o PLGA 85/15. Neste sentido, este será o polímero utilizado para a produção dos *scaffolds* de PLGA/HA.

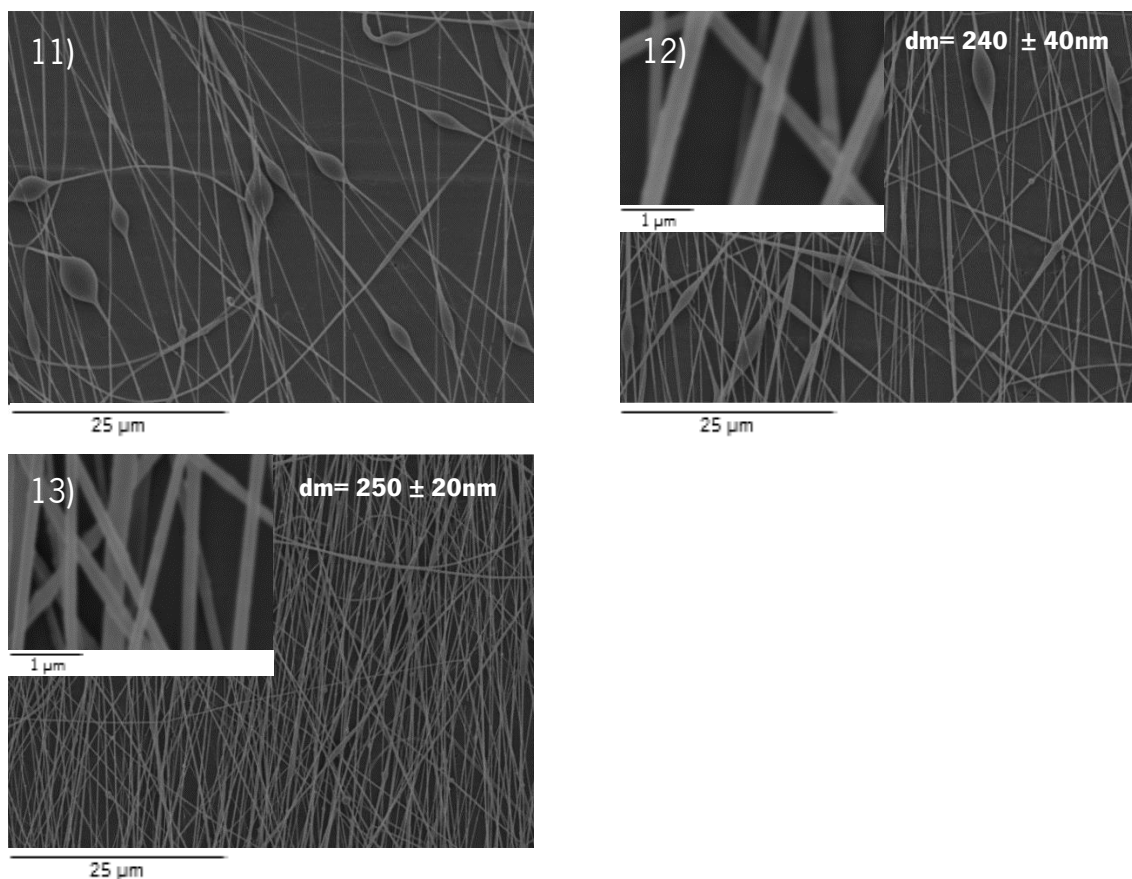
5.4.1 Caraterização morfológica

A caraterização morfológica dos *scaffolds* PLGA/HA produzidos pelo sistema *electrospinning* foi realizada com recurso à análise de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) para a observação do diâmetro e alinhamento e a porosidade foi calculada através das equações utilizadas para o cálculo da porosidade dos *scaffolds* de PLGA (secção 5.2.1).

Na Tabela 5.4 estão apresentados a concentração das soluções e os parâmetros do processo *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de PLGA 85/15 com a adição de diferentes percentagens de HA. Na Figura 5.14 estão apresentadas as imagens de SEM para cada amostra de *scaffolds* de PLGA 85/15 com a adição de 1% de HA.

Tabela 5.4- Concentração das soluções e parâmetros do processo *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de *scaffolds* de PLGA 85/15 com a adição de diferentes percentagens de HA

Amostra	% HA	Concentração da solução [g/ml]	Taxa de fluxo (ml/h)	Velocidade de rotação do coletor (rpm)	Campo elétrico (kV)	Distância entre o coletor e a agulha (cm)
11	1	0,08	0,5	4000	18	20
12		0,12	0,5	4000	18	20
13					24	
14	5	0,14	0,5	4000	24	20
15			1,5			

**Figura 5.14-** Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x das amostras de PLGA 85/15 com a adição de 1% HA

Pela análise das micrografias apresentadas na Figura 5.14, verifica-se que os *scaffolds* de PLGA 85/15 + 1% HA produzidos através de uma solução de concentração de 0,08g/ml (concentração satisfatória para a solução de PLGA 85/15) apresentam a existência de bolhas na constituição das fibras (amostra 11). Deste modo, verifica-se que a viscosidade da solução diminui com a adição das nanopartículas de HA, não satisfazendo a viscosidade necessária para a produção das nanofibras por *electrospinning*. Neste sentido,

a concentração da solução teve que ser aumentada de forma a satisfazer as condições apropriadas para a produção das nanofibras por *electrospinning*. A diminuição da viscosidade pode ser explicada pelo facto do PLGA ser um polímero amorfo mas com capacidade de formar ligações electroestáticas [14]. Nesta perspetiva, o polímero forma ligações com as nanopartículas de HA formando aglomerados, quebrando parcialmente as interações do polímero. Consequentemente, a quebra das interações entre as cadeias poliméricas poderá diminuir a viscosidade, devido ao menor entrelaçamento.

Por este motivo, de forma a eliminar as bolhas previamente existentes foi produzido o *scaffold* referente à amostra 12 com uma concentração superior, como demonstrado na Tabela 5.4. Todavia, a amostra 12 ainda revela a existências de bolhas na estrutura das fibras. Deste modo, a amostra 13 foi produzida com os mesmos parâmetros de processamento do sistema *electrospinning* da amostra 12, contudo de forma a eliminar as bolhas ainda existentes na estrutura fibrosa dos *scaffolds* o campo elétrico foi alterado de 18 para 24kV com o intuito de melhorar o estiramento das fibras. Como consequência, o diâmetro das fibras também variou de 240 para 250nm, sendo este o resultado do aumento do campo elétrico, conseguindo-se eliminar o aparecimento das bolhas.

Também é notável a existência de bolas na estrutura fibrosa dos *scaffolds*. Estas bolas são o resultado da existência das nanopartículas de HA na estrutura, de maior diâmetro que as fibras, como referido anteriormente. Estes resultados explicam o aumento do diâmetro das fibras de PLGA 85/15 + 1% HA em relação ao diâmetro das fibras de PLGA 85/15. O grau de alinhamento das fibras também é inferior às fibras constituídas por PLGA, pois a presença das nanopartículas proporciona um jato irregular diminuído o grau de alinhamento destas.

Após o estudo da morfologia das amostras de PLGA + 1% HA foi realizado o mesmo estudo para as amostras de PLGA + 5% HA. A concentração das soluções e os parâmetros do processo *electrospinning* utilizados para a produção das amostras de PLGA 85/15 com a adição de 5% de HA, estão apresentados na Tabela 5.4. Na Figura 5.15 estão apresentadas as imagens de SEM para cada amostra de *scaffolds* de PLGA 85/15 com a adição de 5% de HA.

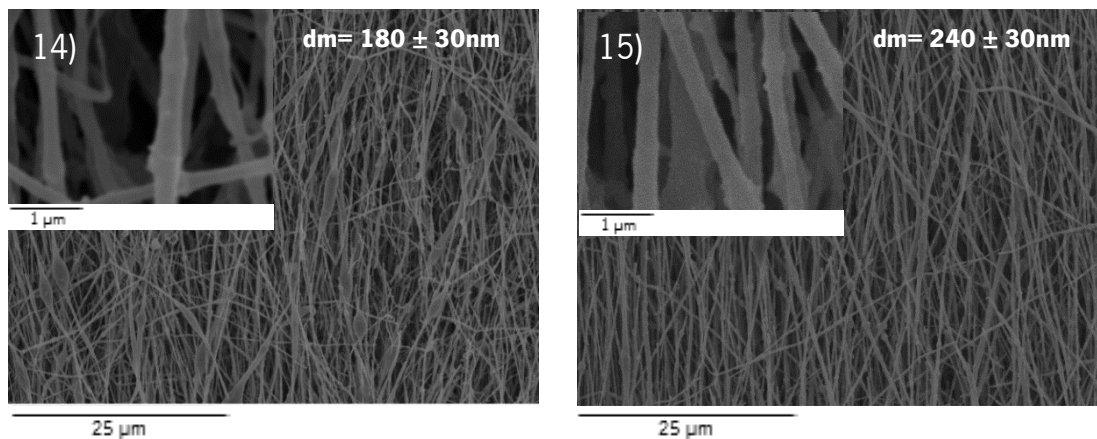


Figura 5.15- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e 35000x das amostras de PLGA 85/15 com a adição de 5% de HA

A amostra 14 foi produzida nas mesmas condições da amostra de PLGA + 1% HA que revelou melhores resultados (amostra 13) mas com uma concentração superior (0,14g/ml). Pela observação da micrografia representada na Figura 5.15 relativa a amostra 14, verifica-se que apesar da concentração da solução de PLGA + 5% HA ter sido aumentada de 0,12 para 0,14g/ml comparativamente às amostras de PLGA + 1% HA, as fibras ainda apresentam diâmetros muito reduzidos (180nm). Sabendo que existem nanopartículas de diâmetros superiores ao diâmetro das fibras, estas estão sujeitas à tração. Neste sentido, os diâmetros reduzidos podem estar associados à existência de uma maior percentagem de HA ocasionando uma maior percentagem de fibras sujeitas à tração entre as nanopartículas, e como consequência estas ficam sujeitas à quebra/rutura.

Como forma de aumentar o diâmetro das fibras, a taxa de fluxo foi aumentada de 0,5 para 1,5ml/h (amostra 15). E após a análise da Figura 5.15, observa-se que as fibras apresentam uma estrutura mais uniforme de diâmetro maior, revelando também a existência de bolas na estrutura. Estas bolas representam, mais uma vez, a existência das nanopartículas de HA na estrutura das fibras de PLGA. Também é notório, pela visualização da Figura 5.15, o aumento do grau alinhamento das fibras da amostra 15 em relação à amostra 14. Isto pode dever-se ao aumento do diâmetro das fibras, provocando uma maior estabilidade do jato e uma menor quebra destas enquanto o solvente evapora.

Tal como realizado anteriormente, também se realizou um estudo mais detalhado do diâmetro médio das fibras para cada amostra de *scaffolds*, através de um gráfico de distribuição. Os gráficos apresentados na Figura 5.16, foram realizados com o auxílio do *software ImageJ*.

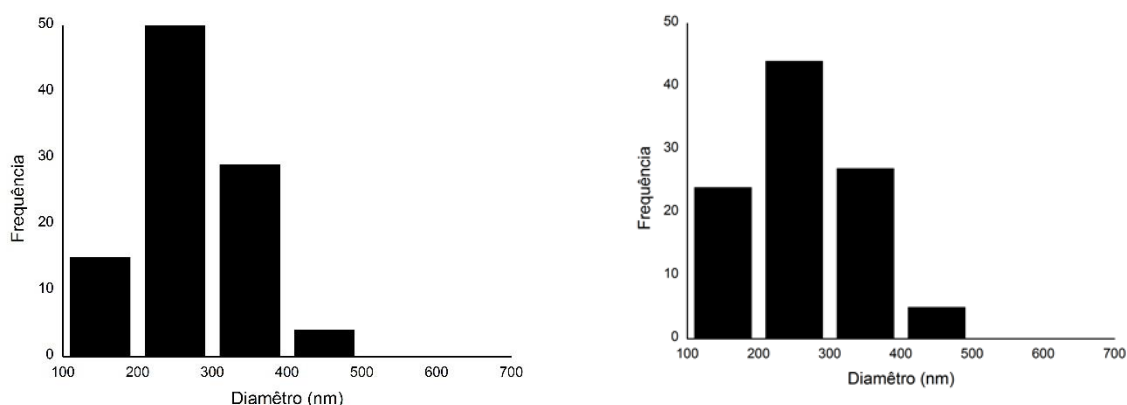


Figura 5.16- Gráficos de distribuição de diâmetros para a) amostra 13 (PLGA 85/15 + 1% HA), b) amostra 15 (PLGA 85/15 + 5% HA)

Como se pode ver na Figura 5.16, os diâmetros médios das amostras de PLGA 85/15 + 1% HA e PLGA 85/15 + 5% HA estão dentro do intervalo requerido (50-500nm). Contudo, a amostra que apresenta uma morfologia mais uniforme, sem a presença de tantas bolas é a amostra 13 (PLGA 85/15 + 1% HA). Neste sentido, no que respeita a morfologia das fibras, a amostra 13 é a que evidencia uma morfologia mais promissora para a sua utilização como *scaffold*.

A porosidade, como referido anteriormente, para além do diâmetro e do alinhamento das fibras é também uma propriedade morfológica que define o bom desempenho dos *scaffolds*. O procedimento utilizado para o cálculo da porosidade foi o utilizado para as amostras de PLGA, utilizando as equações 5.1 e 5.2, referidas na secção 5.2.1. O valor da densidade de *bulk* usado para as amostras foi de 1,25g/cm³, tal como o utilizado para as amostras de PLGA. Este valor é uma aproximação, pois a percentagem de HA adicionada é baixa, não induzindo uma influência significativa neste valor. Na Tabela 5.5, estão definidos os valores utilizados para o cálculo da densidade aparente e a respetiva porosidade para as amostras de PLGA 85/15 e PLGA 85/15 com a adição de 1% e 5% de HA.

Tabela 5.5- Valores utilizados para o cálculo da densidade aparente e a respetiva porosidade para as amostras de PLGA 85/15 e PLGA 85/15 com a adição de 1% e 5% de HA

	PLGA 85/15	PLGA 85/15 + 1% HA	PLGA 85/15 + 5% HA
Massa (mg)	2,80	3,28	1,24
Área (cm²)	1,75	1,75	1,75
Espessura (μm)	99,70	76,50	50,30
Densidade aparente (g/cm³)	0,16	0,25	0,272
Porosidade (%)	87,18 ± 1,1x10 ⁻⁴	80,38 ± 1,0x10 ⁻⁴	78,19 ± 8,0x10 ⁻⁵

Pela análise da Tabela 5.5, denota-se uma diminuição da porosidade com o aumento da percentagem de HA adicionada ao PLGA. A diminuição da porosidade relativamente aos nanocompósitos comparado com os *scaffolds* de PLGA puro pode ser o resultado da dissipação da carga das nanopartículas [15], impedindo a repulsão entre as fibras. Contudo, apesar da diminuição da porosidade, os seus valores ainda estão entre os pretendidos (50% a 90%), conseguindo ainda promover a transferência eficiente de nutrientes, bem como a eliminação contínua de produtos de degradação do polímero durante a sua aplicação como *scaffold*. A diferença entre os valores de porosidade das amostras com diferentes percentagens de adição da HA não é muito significativa, contudo a amostra com uma adição de 1% de HA demonstra valores de porosidade mais elevados, devido à menor percentagem de HA adicionada.

5.4.2 Caracterização mecânica

A caracterização mecânica realizada aos *scaffolds* de PLGA e HA tem como objetivo estudar o módulo de armazenamento e perceber qual a alteração deste com a adição das nanopartículas de HA ao PLGA. Esta caracterização foi realizada com o mesmo procedimento realizado para os *scaffolds* de PLGA, testes de DMA. A Figura 5.17 representa o módulo de armazenamento quando sujeito a diferentes frequências (desde 0,1 a 100Hz) para a amostra de PLGA e para cada amostra com adição de diferentes percentagens de HA ao PLGA.

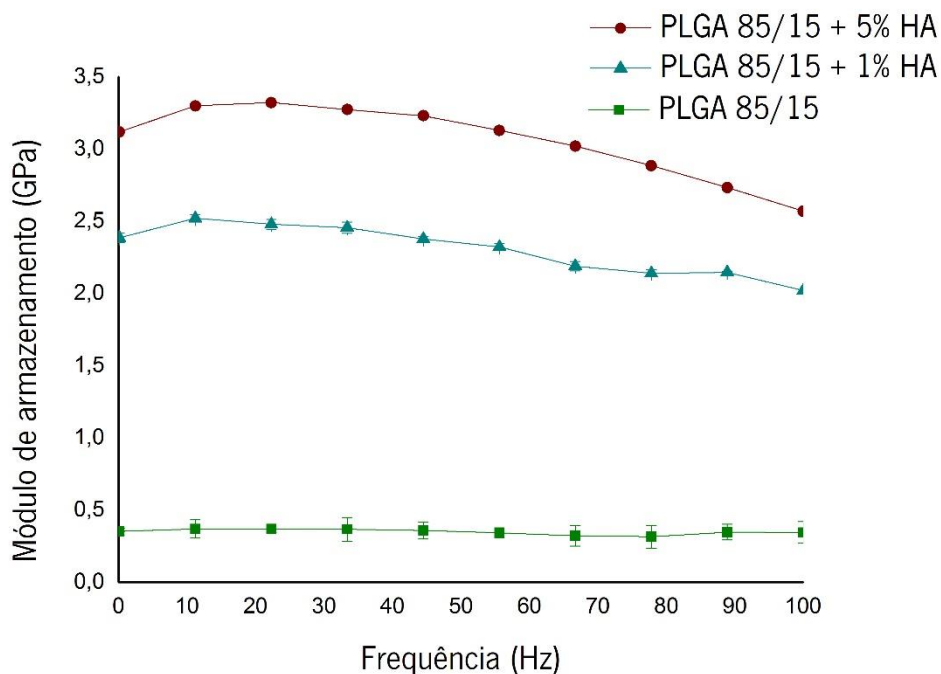


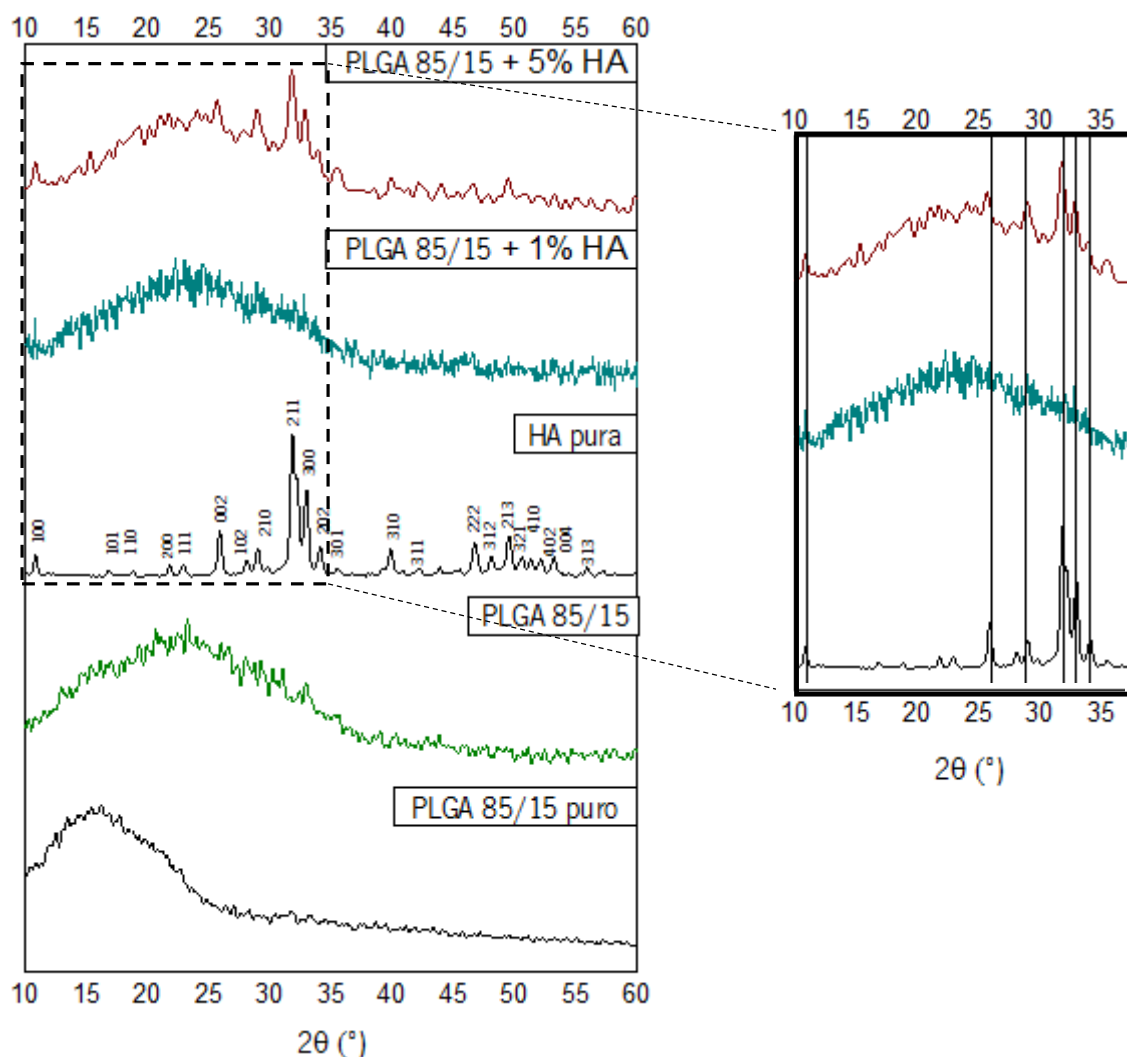
Figura 5.17- Gráfico da variação do módulo de armazenamento com a frequência aplicada para as amostras de PLGA 85/15 e PLGA 85/15 com a adição de 1% e 5% de HA

Pela observação da Figura 5.17 é possível verificar que a adição das nanopartículas de HA altera as propriedades mecânicas dos *scaffolds*. A adição de uma maior percentagem (5%) de HA ao PLGA demonstra uma diminuição do módulo de armazenamento das amostras para as diferentes frequências, isto pode dever-se à presença de uma maior quantidade de nanopartículas HA na morfologia das amostras, resultando uma morfologia menor uniforme. A adição de 1% de HA ao PLGA resultou num aumento de aproximadamente 34MPa para 200MPa do módulo de armazenamento, e uma adição de 5% de HA resultou num aumento para aproximadamente 260MPa, a uma frequência de 100Hz.

Todas as amostras possuem valores de módulos de armazenamento dentro dos valores pretendidos (0,1–5GPa). A adição de pequenas percentagens de HA ao PLGA revelaram um aumento do módulo de armazenamento, este é o efeito da adição do reforço (HA) à matriz polimérica de um nanocompósito. A amostra que revela um módulo de armazenamento superior é a de 5% de HA adicionado ao PLGA, demonstrando assim resultados mais satisfatórios, relativamente ao módulo de Young. Contudo para adição de % de HA superiores ao polímero PLGA poderá resultar numa diminuição do módulo de armazenamento, a concentrações superiores as nanopartículas não têm o comportamento de reforço mas sim atuam como defeito na estrutura fibrosa [16]. Este defeito deve-se à aglomeração das nanopartículas na estrutura, impedindo a boa interface entre a partícula e o polímero, provocando assim uma má transferência de carga.

5.4.3 Caraterização estrutural

Para o estudo da evolução da estrutura cristalina das nanofibras de PLGA com a incorporação de HA, os *scaffolds* referentes a cada amostra foram estudados por XRD. Com este ensaio pretende-se estudar a estrutura cristalina de HA nos nanocompósitos. Para além das nanofibras, como forma de comparação as nanopartículas de HA e o polímero PLGA puro, também foram avaliados por XRD. A Figura 5.18 representada os difratogramas de XRD para cada amostra. A gama de ângulos 2θ analisados foi de 10 a 60° e com uma velocidade de varrimento de 2°/min. Para a indexação dos picos de HA hexagonal foi utilizada a ficha ICDD nº 00-055-0592.



HA pura- hexagonal (ICDD 00-055-0592)

Figura 5.18- Difratomogramas referentes ao PLGA 85/15 puro, à amostra de *scaffold* de PLGA 85/15, à HA pura e às amostras de *scaffolds* de PLGA 85/15 com a adição de 1% e 5% de HA

Pela observação dos difratogramas representados na Figura 5.18, verifica-se a existência de uma banda acentuada na zona de 10° a 30° (2θ), estes advêm da natureza amorfa do copolímero PLGA puro, como pode ser comprovado pela visualização do seu difratograma. Contudo ocorre um aumento da zona amorfa do PLGA puro para o PLGA em fibras, isto poderá ser devido á reação que ocorre do polímero com o solvente (solução realizada para a produção das nanofibras) ou até devido ao estiramento do polímero provado pela morfologia das fibras. Todavia a técnica de difração de raios X não permite explicar o comportamento amorfo dos materiais, teria de se realizar outra caracterização como por exemplo espectroscopia de Raman [17]. Após a incorporação de HA nas nanofibras, os difratogramas apresentam

picos referentes ao espectro típico de HA. Quanto maior a percentagem de HA adicionada maior é a intensidade dos picos relativos ao HA, como se pode verificar na imagem à direita na Figura 5.18. A adição de 1% de HA ao PLGA demonstra alguns picos no difratograma referentes à fase de HA. Contudo a reduzida percentagem de HA deverá gerar grãos de HA muito pequenos cuja intensidade dos picos referentes aos planos de difração existentes não é suficientemente alta, e por isso a natureza amorfa do polímero prevalece. Assim pelos difratogramas obtidos por XRD para cada amostra (nomeadamente para a amostra PLGA + 5% HA) pode-se concluir que os *scaffolds* são realmente constituídos pelo nanocompósito de PLGA/HA.

5.4.4 Caraterização térmica

A caraterização térmica foi realizada com o intuito de se avaliar o comportamento térmico das nanofibras, assim como estudar a variação deste com a adição das nanopartículas de HA ao polímero PLGA. Esta caraterização permite ter uma noção da influência da HA na temperatura de transição vítrea característica do polímero amorfo. Esta caraterização foi realizada com o auxílio de um equipamento de DSC. Para cada amostra foram realizados três ensaios como forma de comprovar os resultados.

Os termogramas relativos a todas as amostras apenas evidenciaram a temperatura de transição vítrea (t_g), característica do polímero amorfo (PLGA). A Figura 5.19 representa os termogramas de DSC e a respetiva temperatura de transição vítrea para as amostras de PLGA com a adição de 0%, 1% e 5% de HA.

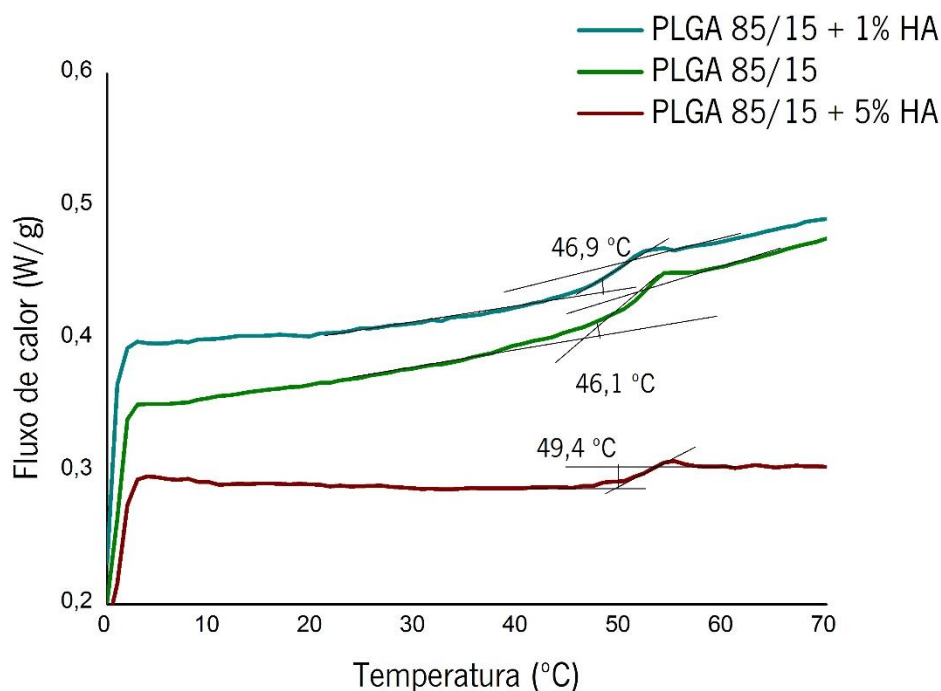


Figura 5.19- Termogramas DSC e respectiva temperatura transição vítrea para as amostras de PLGA 85/15 com 0%, 1% e 5% de HA

Sabendo que a temperatura de transição vítrea é dada pelo desnível apresentado nos termogramas, pela observação da Figura 5.19 verifica-se que estes demonstraram uma temperatura de transição vítrea de 46°C e não de fusão, para as amostras de PLGA 85/15, o que indica que o polímero é essencialmente amorfo. A temperatura de transição vítrea obtida pelo ensaio de DSC é similar à temperatura teórica do polímero puro (45°C) [18]. Também é possível observar na Figura 5.19, que a adição da HA à estrutura fibrosa provoca um aumento da temperatura de transição vítrea, isto deve-se ao impedimento da mobilidade das cadeias do polímero dificultando o movimento desta após a incorporação das nanopartículas [19]. Uma vez que a temperatura fisiológica do corpo é de 37°C e os *scaffolds* não apresentam transições térmicas a esta temperatura, as suas características térmicas poderão não alterar após a sua implantação no corpo humano [20].

5.4.5 Caracterização superficial

A hidrofiliabilidade é uma característica importante para os *scaffolds* para engenharia de tecidos. A hidrofiliabilidade aliada à biocompatibilidade dos *scaffolds* favorecem a adesão, a proliferação e a diferenciação celular o que vai regular a reparação óssea. Para além disto a hidrofiliabilidade pode favorecer a infiltração de oxigénio nos *scaffolds* assim como os constituintes nutritivos representantes do fluido corporal, sendo vitais para o sucesso da reparação óssea [21, 22]. A molhabilidade de substratos poliméricos requerida para favorecer a atividade celular é verificada para ângulos de contacto entre 40 a 70° [23].

No presente trabalho foram realizados testes de molhabilidade, através do qual se pode classificar qualitativamente a superfície como sendo hidrofílica ou hidrofóbica, através do teste da gota sésil. Os testes foram realizados tendo em consideração o método La Place em modo estático com 3µl de água destilada, à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi repetido 10 vezes para cada amostra. A Figura 5.20 representa os resultados para cada amostra de *scaffolds* em estudo (esquerda) e uma imagem obtida pelo *software* de uma medição do ângulo de contacto da amostra de *scaffold* de PLGA (direita).

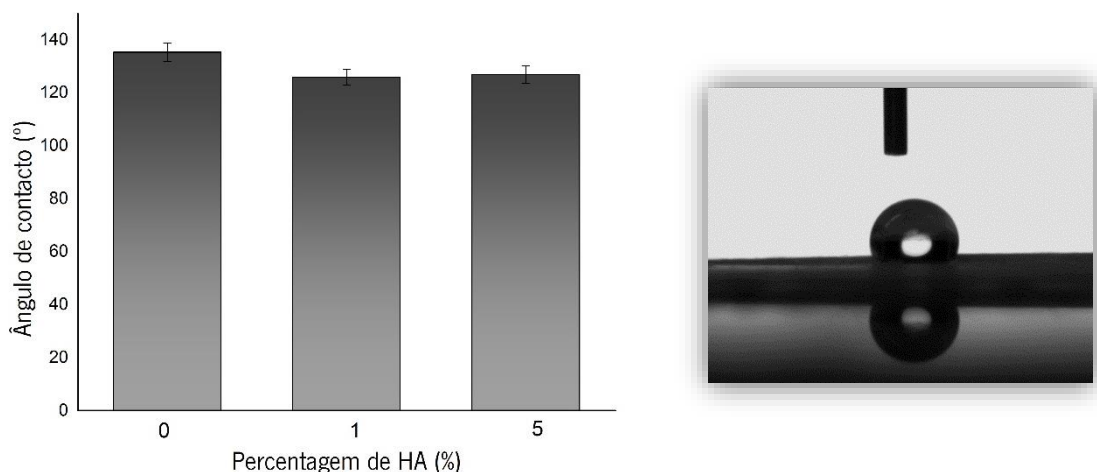


Figura 5.20- Gráfico de ângulos de contacto com água destilada para as amostras de *scaffolds* de PLGA com 0%, 1% e 5% de HA (esquerda) e imagem obtida pelo *software* de uma medição do ângulo de contacto da amostra de *scaffolds* de PLGA com 0% de HA (direita)

Como se pode observar na Figura 5.20, as amostras tanto de PLGA puro como as de PLGA com a incorporação de nanopartículas de HA demonstram valores muito elevados para os ângulos de contacto. Neste sentido revelam uma superfície com uma reduzida tendência para ser molhada o que é característico de um comportamento super hidrofóbico, não representando os valores típicos para o polímero de PLGA ($\pm 100^\circ$) [24]. Os valores elevados que apresentam podem ser o resultado do efeito da topografia das nanofibras. A incorporação de HA não alterou significativamente a molhabilidade da superfície dos *scaffolds* de PLGA.

Como referido anteriormente, para *scaffolds* para engenharia de tecidos seria benéfico que a superfície tivesse um comportamento hidrofílico ($\theta < 90^\circ$) [25]. Tendo em conta estes resultados, os *scaffolds* em estudo teriam de sofrer um tratamento de superfície, tornando a sua superfície hidrofílica. Os tratamentos de superfície, como forma de diminuir o ângulo de contacto, passíveis de ser utilizados em polímeros poderiam ser tratamentos por plasma inerte de Ar ou por plasma reativo de $\text{Ar-NH}_3/\text{H}_2$. Estes tratamentos têm por objetivo incorporar azoto na estrutura fibrosa dos *scaffolds* de forma a alterar as características químicas da superfície não alterando as suas propriedades físicas [26].

5.4.6 Teste *in vitro* de biodegradação

A formação do tecido ósseo ocorre no período de 3 a 6 meses após a injeção do *scaffold* no corpo do paciente. Ao fim, deste tempo a biodegradação do polímero deverá ocorrer de modo a não obstruir a reparação óssea, uma vez que já não é necessária. A biodegradação é uma etapa essencial na engenharia de tecidos com o intuito de prevenir riscos a longo prazo, devido à existência de um material estranho ao corpo. No presente trabalho, foi estudada a absorção do PBS pelos *scaffolds* e a sua perda de massa durante duas semanas, com intuito de estimar a capacidade de biodegradação dos *scaffolds* estudados. Deste modo, foram estudadas amostras de *scaffolds* de PLGA 85/15 e PLGA 85/15 com a adição de 1% de HA imersas em PBS durante 2 semanas, como forma de estudar a influência da adição de nanopartículas de HA à matriz polimérica quanto à absorção de PBS e à perda de massa dos *scaffolds* ao longo do tempo.

Os testes foram realizados com imersão das amostras em PBS à temperatura de 37°C (temperatura fisiológica) em atmosfera não controlada durante 3 dias, 1 semana, 10 dias e 2 semanas, para a medição da absorção do PBS pelos *scaffolds*. Após a imersão e com renovação de fluido PBS foi calculada a perda de massa dos *scaffolds*, tendo em consideração os tempos de imersão estudados. Estes testes foram repetidos 2 vezes com intuito de validar estatisticamente os seus resultados.

No presente trabalho, não foi possível estudar a biodegradação da amostra PLGA 85/15 com a adição de 5% de HA, devido a restrições de tempo e falta de material. Assim o estudo da absorção e da perda de massa dos *scaffolds* focalizou-se nas amostras de PLGA 85/15 e PLGA 85/15 com a adição de 1% de HA. No entanto, esta amostra apesar de revelar um módulo de Young, comparativamente à amostra de PLGA 85/15 com 5% de HA inferior, revela um valor de porosidade superior além de uma morfologia mais uniforme. Assim do ponto de vista de regeneração óssea esta amostra poderá ser mais vantajosa. Deste modo, poderá não ser necessário a utilização de uma quantidade de material osteocondutor (HA) superior. Contudo, seria necessário a realização de mais testes, de forma a poder comprovar qual a amostra com melhor resposta biológica. A Figura 5.21 representa os resultados da absorção de PBS pelos *scaffolds* e a Figura 5.22 representa a perda de massa para cada amostra.

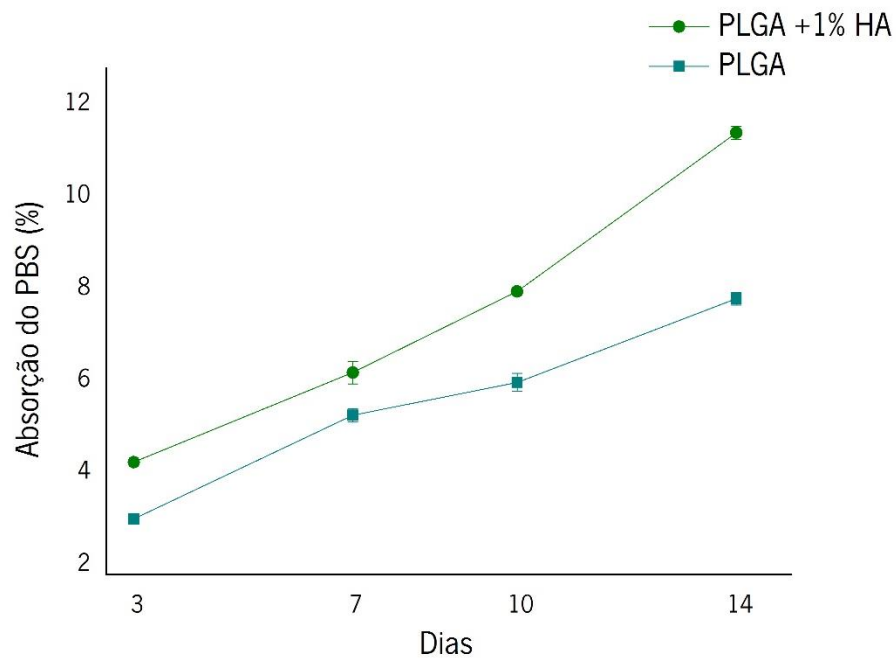


Figura 5.21- Percentagem de absorção do PBS pelos *scaffolds* de PLGA 85/15 e de PLGA 85/15 + 1% HA

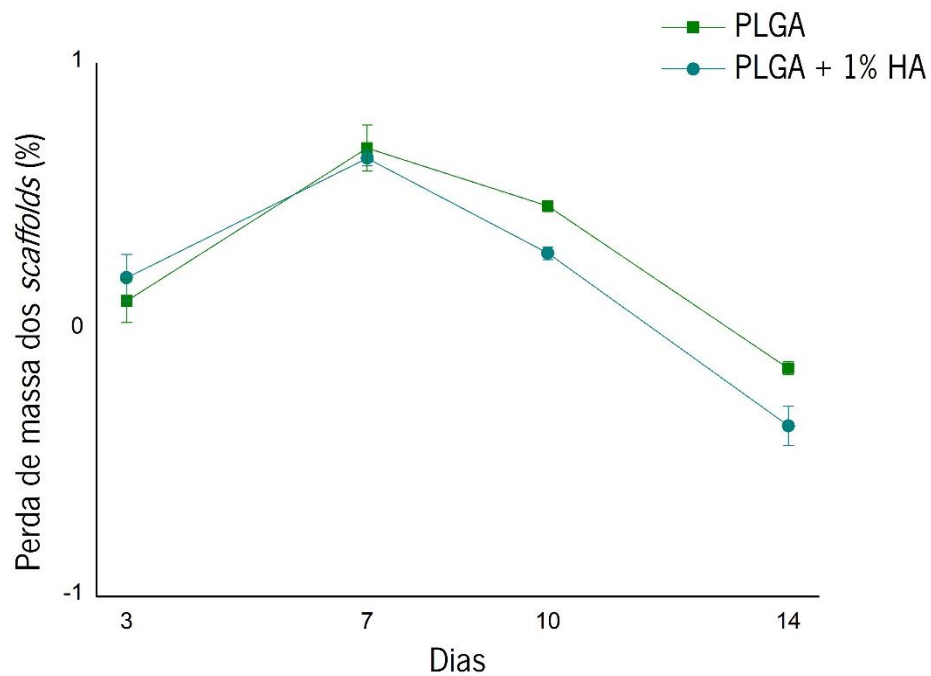
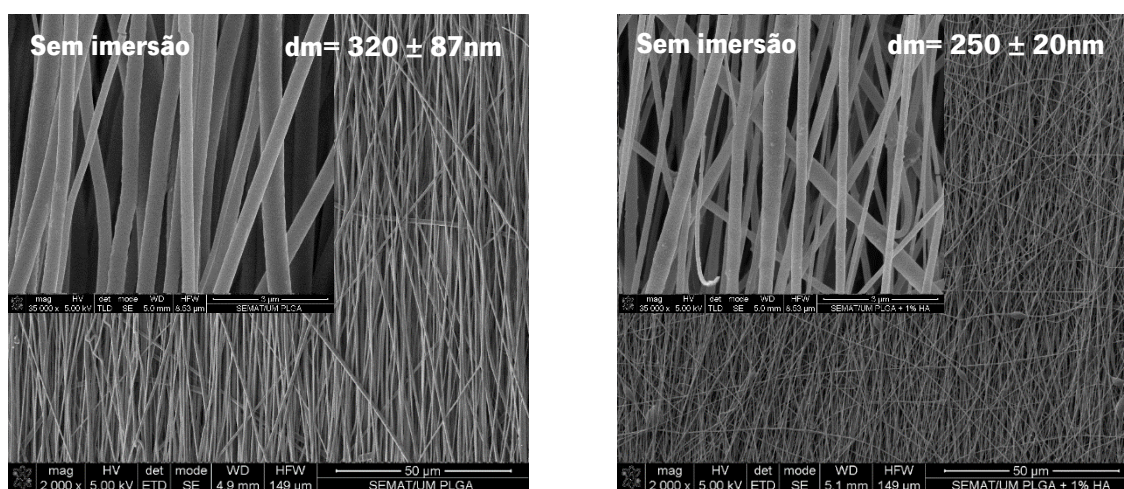


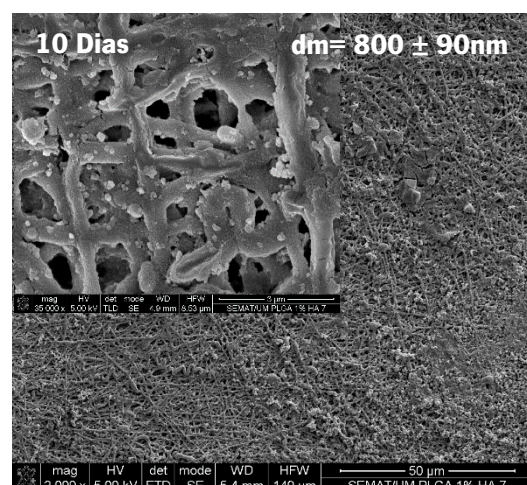
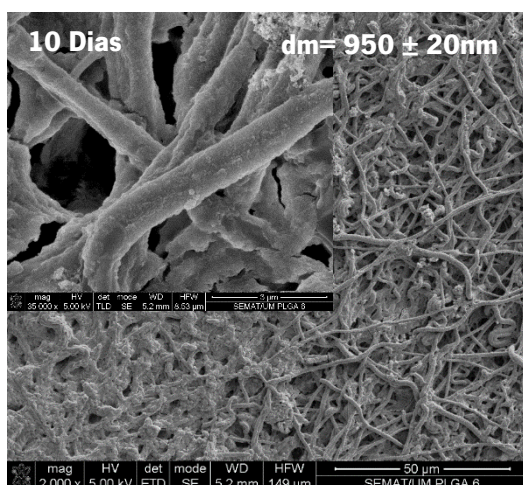
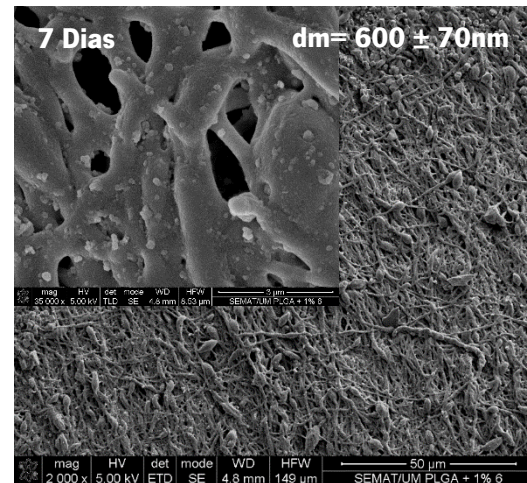
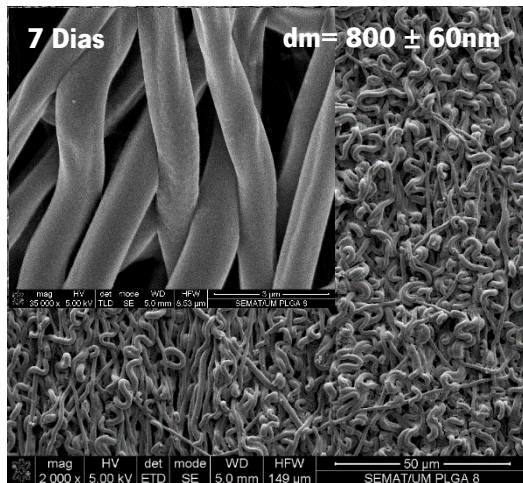
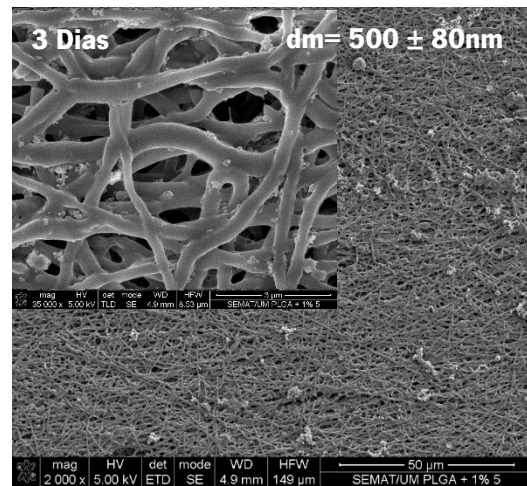
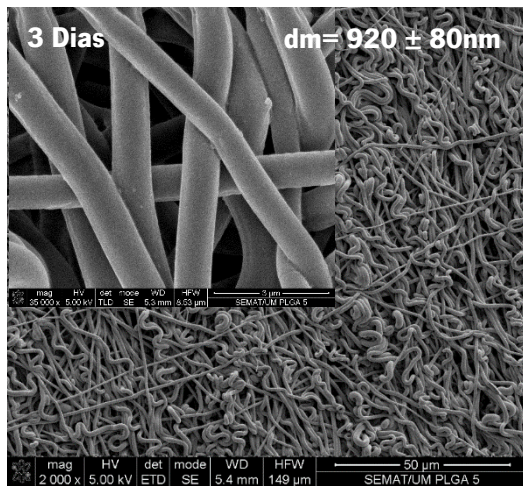
Figura 5.22- Efeito da degradação da massa dos *scaffolds* de PLGA 85/15 e de PLGA 85/15 + 1% HA

A absorção do PSB pelos *scaffolds*, assim como a perda de massa são processos interligados visto que ambos acontecem em simultâneo. Como se pode observar na Figura 5.21, todas as amostras têm capacidade de absorver o PBS, e esta absorção tem tendência a aumentar consoante aumento do tempo de imersão no fluido de PBS. A absorção do PBS pelos *scaffolds*, isto é a penetração do fluido corporal nos poros da estrutura fibrosa do *scaffolds* é importante para bioatividade [27]. A amostra de PLGA com a adição de 1% de HA revela uma maior percentagem de absorção de PBS comparativamente à amostra de PLGA puro, isto poderá dever-se à existência de nanopartículas de HA na superfície das fibras resultando numa maior absorção por capilaridade pelo meio da interface das nanopartículas [28]. Assim a amostra de PLGA 85/15 + 1% HA demonstra assim resultados mais promissores para a osteocondutividade.

Os dados relativos à perda de massa das amostras (Figura 5.22) mostram que quanto maior for a percentagem de PBS absorvida pelos *scaffolds* maior será a perda de massa. Contudo, para as imersões durante 10 dias, a massa das amostras aumenta. Este aumento poderá dever-se à existência do fluido PBS na superfície das amostras. O processo de secagem das amostras foi realizado na estufa, com atmosfera ao ar, durante dois dias, contudo para a evaporação total do PBS, as amostras deveriam ter sido secas em vácuo a 37°C. Este procedimento não foi utilizado devido a restrições técnicas dos equipamentos disponíveis, nomeadamente da estabilidade da temperatura, relativamente baixa.

De forma a estudar a influência do PBS na morfologia dos *scaffolds* assim como comprovar a existência dos cristais constituintes do fluido na superfície dos *scaffolds*, após 2 semanas de imersão, as amostras foram analisadas por SEM. As micrografias SEM referentes às amostras relativas a cada tempo de imersão, após o processo de secagem, estão representadas na Figura 5.23.





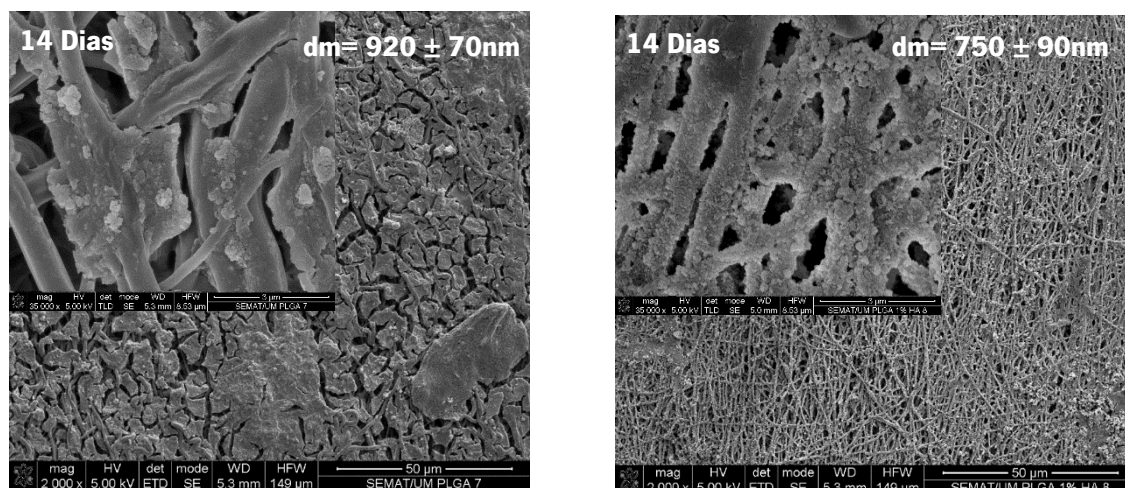


Figura 5.23- Micrografias SEM com uma ampliação de 2000x e de 35000x dos *scaffolds* de PLGA (esquerda) e PLGA + 1% de HA (direita) antes de imersão e após 3 dias, 1 semana, 10 dias e 2 semanas de imersão do PBS

Como se pode ver na Figura 5.23, as micrografias das amostras de *scaffolds* tanto de PLGA como de PLGA com a adição de 1% de HA após 2 semanas de imersão ainda apresentam uma estrutura fibrosa. Contudo após a imersão das fibras no PBS a sua morfologia sofreu algumas alterações, sendo estas mais notórias com o aumento do tempo de imersão. O diâmetro das fibras aumentou, sendo o resultado da absorção do PBS. Para além da alteração do diâmetro, o alinhamento das fibras também foi afetado, isto poderá dever-se à diminuição da temperatura de transição vítrea devido à absorção do PBS, como referido anteriormente. Deste modo, as cadeias ganham mobilidade e por sua vez estas apresentam alguma memória da sua conformação aleatória e de recuo na tentativa de recuperar a sua conformação mais estável [29].

Tal como era espectável, com o aumento do tempo de imersão dos *scaffolds* no fluido PBS as micrografias (Figura 5.23) apresentam aglomerados dos cristais constituintes do fluido. Para os *scaffolds* de PLGA com a adição de 1% de HA também é visível a existência de nanopartículas de HA à superfície das fibras. Estas nanopartículas provêm da incorporação de HA na estrutura das fibras. Sendo este um comportamento benéfico quando os *scaffolds* forem implantados no corpo, pois demonstram bioatividade. De forma a comprovar e distinguir os cristais constituintes do PBS e as nanopartículas de HA existentes nas amostras foi realizado EDS na amostra de PLGA com a adição de 1% de HA imersa durante 2 semanas (Figura 5.24).

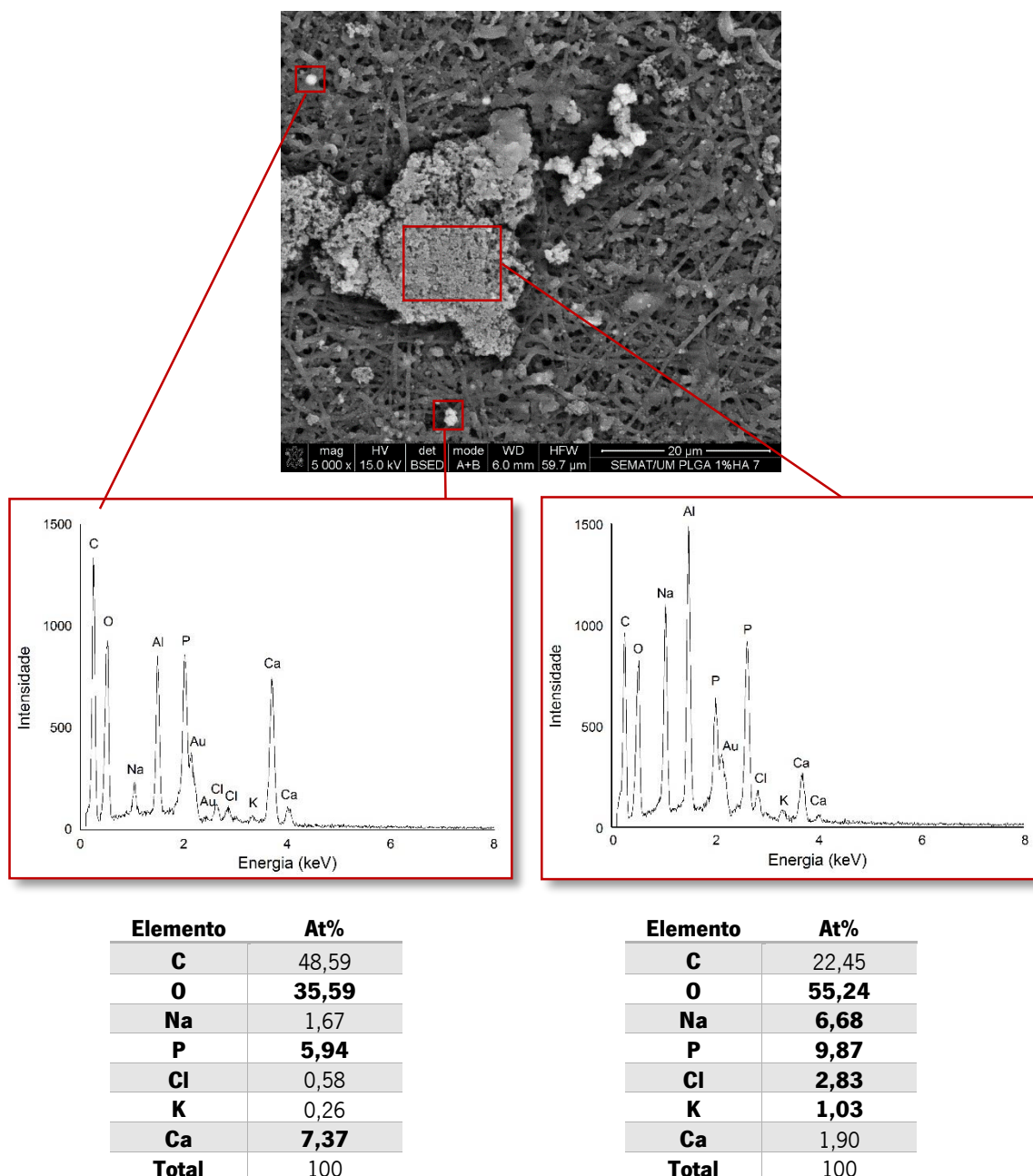


Figura 5.24- Micrografia SEM com uma ampliação de 5000x da amostra de PLGA com a adição de 1% de HA após 2 semanas de imersão do PBS e espectros de EDS e respetivas tabelas com as percentagens atômicas correspondentes à zona da amostra selecionada

Através dos espectros de EDS apresentados na Figura 5.24 é possível comprovar a existência de cristais constituintes do fluido PBS na superfície da amostra de PLGA + 1% HA, assim como a existência de nanopartículas, incorporadas previamente durante o processo de *electrospinning*, à superfície das fibras. A existência de cristais do fluido também ocorre para a amostra PLGA 85/15. A existência das nanopartículas de HA na superfície das fibras é comprovada pela quantidade de oxigénio, fósforo e cálcio que contem a

amostra na zona indicada à esquerda da Figura 5.24. Os cristais constituintes do fluido PBS são comprovados pela existência notória de oxigénio, sódio, fósforo, cloro e potássio indicada à direita da Figura 5.24. Deste modo, as nanopartículas encontram-se com uma geometria redonda parcialmente simétrica e os cristais apresentam-se aglomerados sobre a superfície das fibras com uma geometria assimétrica. Os espectros de ambas as zonas revelam a presença de carbono, ouro e alumínio, sendo o carbono derivado do polímero, o ouro é o revestimento utilizado para a visualização das fibras por SEM e a existência do alumínio deve-se ao facto das amostras terem sido embrulhadas em papel de alumínio para a realização do teste de biodegradação.

Concludentemente, os *scaffolds* de PLGA + 1% de HA apresentam resultados promissores quanto aos testes de biodegradação. O teste revelou que eles têm capacidade de absorver o fluido PBS sem se degradarem substancialmente após duas semanas de imersão no fluido PBS além de possuírem cristais do fluido à superfície que sugerem que os *scaffolds* têm capacidade para interagir com o fluido e fazer trocas iónicas. Acrescenta ainda o facto de as nanopartículas de HA incorporadas durante o processo de *electrospinning* difundirem para a superfície das nanofibras o que também é promissor, uma vez que poderá promover a bioatividade, facilitando a reparação óssea. Por outro lado, a perda de massa não revelou ser muito significativa, induzindo uma tendência para suporte estrutural ao osso durante o seu tempo de crescimento e reparação do mesmo. Ainda assim, nada pode ser aferido acerca da biodegradação expectável para o polímero após 6 meses de injeção, testes mais demorados devem ser feitos para estimar qual será a melhor solução a este nível.

5.5 Referências bibliográficas

- [1] M. Kakade, S. Givens, K. Gardner, and K. Lee, "Electric Field Induced Orientation of Polymer Chains in Macroscopically Aligned Electrospun Polymer Nanofibers," *American Chemical Society*, vol. 129, pp. 2777-2782, 2007.
- [2] C. J. Thompson, G. G. Chase, A. L. Yarin, and D. H. Reneker, "Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model," in *Polymer*. vol. 48, ed, 2013, pp. pp 15-28.
- [3] V. Milleret, B. Simona, P. Neuenschwander, and H. Hall, "Tuning electrospinning parameters for production of 3D-fiber-fleeces with increased porosity for soft tissue engineering applications," *Eur Cell Mater*, vol. 21, pp. 286-303, 2011.
- [4] Z.-M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites," *Composites Science and Technology*, vol. 63, pp. 2223-2253, 2003.
- [5] W. E. Teo and S. Ramakrishna, "A review on electrospinning design and nanofibre assemblies," *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 89-106, 2006.
- [6] A. Martins, J. V. Araújo, R. L. Reis, and N. M. Neves, "Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications," *Nanomedicine*, vol. 2, pp. 929-942, 2007.
- [7] S. Liao, R. Murugan, C. K. Chan, and S. Ramakrishna, "Processing nanoengineered scaffolds through electrospinning and mineralization suitable for biomimetic bone tissue engineering," *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 1, pp. 252-60, Jul 2008.

- [8] F. Liu, R. Guo, M. Shen, S. Wang, and X. Shi, "Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Poly [(lactic acid)-co-(glycolic acid)] Nanofibers," *Macromolecular materials and engineering*, vol. 294, pp. 666-672, 2009.
- [9] H. Fouad, T. Elsarnagawy, F. N. Almajhdi, and K. A. Khalil, "Preparation and in vitro thermo-mechanical characterization of electrospun PLGA nanofibers for soft and hard tissue replacement," *Int J Electrochem Sci*, vol. 8, pp. 2293-304, 2013.
- [10] M. J. Gomez-Benito, L. A. Gonzalez-Torres, E. Reina-Romo, J. Grasa, B. Seral, and J. M. Garcia-Aznar, "Influence of high-frequency cyclical stimulation on the bone fracture-healing process: mathematical and experimental models," *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, vol. 369, pp. 4278-94, Nov 13 2011.
- [11] E. Ozcivici, Y. K. Luu, B. Adler, Y. X. Qin, J. Rubin, S. Judex, and C. T. Rubin, "Mechanical signals as anabolic agents in bone," *Nat Rev Rheumatol*, vol. 6, pp. 50-9, Jan 2010.
- [12] S. Cassu and F. Maria, "Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas," *Química Nova*, vol. 28, pp. 255-263, 2005.
- [13] R. J. DeVolder, I. W. Kim, E. S. Kim, and H. Kong, "Modulating the rigidity and mineralization of collagen gels using poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles," *Tissue Eng Part A*, vol. 18, pp. 1642-51, Aug 2012.
- [14] D. T. M. Yaszemski, K. Lewandrowski, V. Hasirci, D. Altobelli, D. Wise, "Tissue Engineering And Novel Delivery Systems," M. Dekker, Ed., ed New york, 2004, p. 620.
- [15] Y. X. Huang, J. Ren, C. Chen, T. B. Ren, and X. Y. Zhou, "Preparation and properties of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/ nano-hydroxyapatite (NHA) scaffolds by thermally induced phase separation and rabbit MSCs culture on scaffolds," *Journal of biomaterials applications*, vol. 22, pp. 409-32, 2008.
- [16] Z. Cui, G. Oommen, J. Triffitt, H. Ye, and P. A. Mouthuy, "Physico-chemical characterization of functional electrospun scaffolds for bone and cartilage tissue engineering," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 224, pp. 1401-1414, 2010.
- [17] K. Andrikopoulos, S. Yannopoulos, G. Voyiatzis, A. Kolobov, M. Ribes, and J. Tominaga, "Raman scattering study of the a-GeTe structure and possible mechanism for the amorphous-to-crystal transition," *J. Phys. Condens. Matter.*, vol. 18, pp. 965-979, 2006.
- [18] M. Muthu, "Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer An overview," *Asian Journal of Pharmaceutics*, vol. 3, pp. 266-273, 2009.
- [19] L. Wu, J. Zhang, D. Jing, and J. Ding, ""Wet-state" mechanical properties of three-dimensional polyester porous scaffolds," *J Biomed Mater Res A*, vol. 76, pp. 264-71, Feb 2006.
- [20] P. Coimbra, P. Alves, T. A. Valente, R. Santos, I. J. Correia, and P. Ferreira, "Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: synthesis and characterization," *Int J Biol Macromol*, vol. 49, pp. 573-9, Nov 1 2011.
- [21] C. Wang, G. Meng, L. Zhang, Z. Xiong, and J. Liu, "Physical properties and biocompatibility of a core-sheath structure composite scaffold for bone tissue engineering in vitro," *J Biomed Biotechnol*, vol. 2012, pp. 1-9, 2012.
- [22] Z. X. Meng, Y. S. Wang, C. Ma, W. Zheng, L. Li, and Y. F. Zheng, "Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 30, pp. 1204-1210, 2010.
- [23] Y. Arima and H. Iwata, "Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers," *Biomaterials*, vol. 28, pp. 3074-82, Jul 2007.
- [24] F. Ajalloueian, H. Tavanai, J. Hilborn, O. Donzel-Gargand, K. Leifer, A. Wickham, and A. Arpanaei, "Emulsion electrospinning as an approach to fabricate PLGA/chitosan nanofibers for biomedical applications," *Biomed Res Int*, vol. 2014, p. 475280, 2014.
- [25] Y. Yuan and T. R. Lee, "Contact Angle and Wetting Properties," vol. 51, pp. 3-34, 2013.

- [26] Q. Cheng, B. L. Lee, K. Komvopoulos, Z. Yan, and S. Li, "Plasma surface chemical treatment of electrospun poly(L-lactide) microfibrinous scaffolds for enhanced cell adhesion, growth, and infiltration," *Tissue Eng Part A*, vol. 19, pp. 1188-98, May 2013.
- [27] L. Wu and J. Ding, "In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 5821-5830, Dec 2004.
- [28] T. K. N. Sultana, "In Vitro Degradation of PHBV Scaffolds and nHA/PHBV Composite Scaffolds Containing Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Tissue Engineering," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2012, pp. 1-12, 2012.
- [29] S. Wang and Y. Zhang, "Preparation, structure, and in vitro degradation behavior of the electrospun poly(lactide-co-glycolide) ultrafine fibrous vascular scaffold," *Fibers and Polymers*, vol. 13, pp. 754-761, 2012.

Conclusão

No presente trabalho foram produzidos *scaffolds* para regeneração óssea. Os *scaffolds* estudados são constituídos por nanofibras do compósito PLGA/HA e produzidos por *electrospinning*. Foram testadas as propriedades morfológicas e mecânicas de duas diferentes proporções dos monómeros constituintes do polímero PLGA (85/15 e 75/25). Após a escolha da proporção do polímero a utilizar, foram produzidos *scaffolds* de diferentes percentagens de HA (1% e 5%) adicionadas ao polímero PLGA. Após a produção dos *scaffolds*, estes foram testados a nível morfológico, mecânico, estrutural, térmico e superficial. Por fim foi também testada a biodegradação *in vitro* dos *scaffolds* constituídos pelo polímero PLGA e pelo compósito PLGA/HA.

Antes da produção dos *scaffolds* foram produzidas amostras de outro polímero (PVA) como forma de avaliar a influência dos parâmetros de processo do sistema *electrospinning* na morfologia das fibras (alinhamento e diâmetro). Todos os parâmetros demonstraram ter influência no diâmetro destas excepto a velocidade de rotação do coletor. O grau de alinhamento das fibras é favorecido com o aumento do campo elétrico, da distância entre o coletor e agulha e da velocidade de rotação do coletor. O tipo de coletor que revelou resultados mais promissores quanto ao alinhamento foi o coletor rotativo convencional.

De forma a conseguir morfologias dos *scaffolds* semelhantes às do osso nativo, a produção das amostras de PLGA para ambas as proporções dos seus monómeros, exigiu um ajuste das concentrações das soluções e dos parâmetros de processamento das nanofibras, tendo como base as otimizações realizadas com o polímero PVA. Após todos os ajustes obteve-se amostras de PLGA 85/15 e PLGA 75/25 com diâmetros dentro dos valores pretendidos (50 a 500nm). Quanto à porosidade, os *scaffolds* de PLGA 85/15 e PLGA 75/25 encontram-se entre os limites de porosidade pretendidos (50%-90%), sendo de 87,18% e de 86,31%, respetivamente. O ensaio de DMA realizado a cada amostra demonstrou que o módulo de Young (equivalente ao módulo de armazenamento) da amostra de PLGA 85/15 apresenta um valor mais aproximado ao do osso (0,1-5GPa). Contudo, ambos estão entre os limites de valores pretendidos, o PLGA 85/15 apresenta 0,3GPa e o PLGA 75/25 apresenta um valor de 0,1GPa para o módulo de Young a uma frequência de 100Hz. Contudo apesar de a diferença não ser significativa a amostra de PLGA 85/15 revelou mais uma vez ser promissora para a aplicação em estudo, tendo sido este o polímero utilizado para os testes posteriores.

Antes de se iniciar a produção da solução de PLGA/HA, foi necessário estudar qual o tempo ideal de imersão da solução no banho de ultrassons, com o intuito de desaglomerar as nanopartículas de HA. O teste revelou que para ambas as percentagens de HA adicionadas, duas horas é suficiente para ocorrer a desaglomeração de HA quase na totalidade. A adição de HA ao polímero PLGA demonstrou ter influência

na viscosidade da solução, assim a concentração de cada solução sofreu ajustes para se conseguir produzir fibras, com as propriedades requeridas.

A morfologia das amostras relativas às duas percentagens de HA adicionadas ao PLGA foram analisadas por SEM, revelando uma geometria alinhada e com diâmetros entre 200 e 300nm, encontrando-se entre os valores pretendidos (50-500nm). No entanto a adição de 1% de HA revelou uma morfologia mais uniforme, devido à menor existência de nanopartículas de HA na estrutura. No que concerne a porosidade, a adição das nanopartículas de HA impulsionou a diminuição da porosidade quando em comparação com o PLGA. Neste sentido a amostra com uma adição de 1% de HA possui maior valor de porosidade (80,38%). O ensaio de DMA demonstrou que a adição de HA ao polímero ocasiona um aumento no módulo de Young dos *scaffolds*, deste modo a amostra de PLGA + 5% HA revelou um módulo de Young mais elevado (2,7GPa a 100Hz). A difração de raios X comprovou a existência de HA na estrutura das fibras confirmando assim a existência de um nanocompósito. Quanto à caracterização térmica, o ensaio de DSC revelou que as amostras possuem valores de temperatura de transição vítrea superior à temperatura fisiológica, neste sentido os *scaffolds* poderão não alterar as suas características térmicas após a sua implantação no corpo humano. Para o estudo da superfície dos *scaffolds* recorreu-se ao teste da gota séssil. Este teste revelou que os *scaffolds* necessitam de um tratamento superficial para se tornarem hidrofílicos de forma a promoverem a adesão, a proliferação e a diferenciação celular.

In vitro a amostra de PLGA com uma adição de 1% de HA demonstrou ter uma maior capacidade de absorção de PBS comparativamente à amostra de PLGA. Esta capacidade de absorção favorece a penetração do fluido corporal pelos poros da estrutura fibrosa dos *scaffolds* constituindo uma característica importante para o reconhecimento destes pelo corpo. As micrografias de SEM após a imersão de PBS demonstram o facto de as nanopartículas de HA incorporadas durante o processo de *electrospinning* difundirem para a superfície das nanofibras o que também é promissor, uma vez que poderá promover o reconhecimento do *scaffold* pelo organismo, facilitando a reparação óssea. A amostra também revelou que após duas semanas de imersão no fluido corporal, não indica uma perda de massa muito significativa, induzindo uma tendência de suporte estrutural ao osso durante o seu tempo de crescimento.

Proposta para trabalhos futuros

Tendo por base os resultados obtidos durante a realização desta dissertação e, com o intuito de aprofundar o estudo realizado seria importante a realização de mais ensaios.

No que respeita as soluções realizadas para a produção dos *scaffolds* de PLGA/HA por *electrospinning* seria importante efetuar um estudo de todas as propriedades destas, que afetam a morfologia final das nanofibras. No presente trabalho foram estudadas, a tensão superficial, a massa molecular do polímero e o tipo de solvente utilizado. No entanto para um maior controlo do processo, seria importante de igual forma ter conhecimento da viscosidade da solução e da sua condutividade elétrica.

No que concerne o caracterização mecânica seria benéfico realizar os ensaios de DMA imersos em PBS e a uma temperatura de 37°C (temperatura fisiológica) de forma a mimetizar as condições a que os *scaffolds* vão estar sujeitos após a sua implantação no corpo humano.

O teste da gota séssil elaborado aos *scaffolds* constituídos pelo compósito PLGA/HA revelou que estes possuem uma superfície super hidrofóbica, este comportamento não é satisfatório, pois a hidrofobicidade da superfície do *scaffold* favorece a adesão, a proliferação e a diferenciação celular. Neste sentido, torna-se importante a realização de um tratamento de superfície por plasma, de forma a incorporar azoto na estrutura fibrosa dos *scaffolds*, com vista a alterar as suas características de superfície.

Relativamente, ao teste *in vitro* de biodegradação seria importante fazer a secagem das amostras, numa estufa em vácuo a 37°C, após a imersão destas no fluido PBS durante o tempo pretendido, com o objetivo de evaporar o fluido na totalidade. Também seria interessante, a elaboração deste mesmo teste durante um tempo mais prolongado, estudando o comportamento dos *scaffolds* até ao crescimento do osso (3 a 6 meses).

Com o objetivo de validar os *scaffolds* quanto á adesão, proliferação e diferenciação celular seria importante a realização de um teste bio de cultura de células. O teste bio engloba várias etapas, semear células osteoblastos, verificar a viabilidade destas, estudar a proliferação e adesão celular e por fim analisar através de SEM a distribuição e a morfologia das células depois da sua cultura.

Anexo I: Composição química do PBS

Composição química do PBS (pH: 7,4; 1L)

Componente	Quantidade (g)
NaCl	8
KCl	0,2
KH ₂ PO ₄	1,44
Na ₂ HPO ₄	0,24
H ₂ O	1000

Anexo II: Micrografias SEM com uma ampliação de 1000x para quatro tempos de imersão (1h30m, 2h, 3h e 6h) das nanopartículas de HA da solução HFP e 5% de HA

